



VYUŽITÍ KOPOLYMERU POLY(L-LACTIDE-CO-E-CAPROLACTONE) PRO FUNKCIONALIZACI NANOVLÁKENNÝCH NOSIČŮ

Bakalářská práce

Studijní program: B3107 – Textil
Studijní obor: 3106R016 – Textilní technologie, materiály a nanomateriály
Autor práce: **Kristýna Havlíčková**
Vedoucí práce: Ing. Aleš Šaman





APPLICATION OF THE COPOLYMER POLY(L-LACTIDE-CO-E-CAPROLACTONE) FOR THE NANOFIBER SCAFFOLDS FUNCTIONALION

Bachelor thesis

Study programme: B3107 – Textil
Study branch: 3106R016 – Textile Technologies, Materials and Nanomaterials
Author: **Kristýna Havlíčková**
Supervisor: Ing. Aleš Šaman



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Havlíčková**
Osobní číslo: **T12000263**
Studijní program: **B3107 Textil**
Studijní obor: **Textilní technologie, materiály a nanomateriály**
Název tématu: **Využití kopolymeru poly(L-lactide-co-e-caprolactone) pro
funkcionalizaci nanovláknenných nosičů**
Zadávající katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat řešení na dané téma.
2. Studium vlivu molekulové hmotnosti případně poměru jednotlivých složek kopolymeru PLCL.
3. Inkorporace aktivních látek do roztoků PLCL a sledování kinetiky uvolňování.
4. Diskuze výsledků, vyhodnocení dosažených výsledků.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. BOCK, N., DARGAVILLE, T., R., WOODRUFF, M., A. (2012),
Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art Review
Article. Progress in Polymer Science, Vol. 37, No. 11, s 1510-1551.
2. Fernández, J., et al., 2012a. Synthesis, structure and properties of
poly(L-lactide-co-e-caprolactone) statistical copolymers. Journal of the
Mechanical Behavior of Biomedical Materials, September, pp. 100-112.
3. ELIAS, H., G., Macromolecules Volume 1, Chemical structure and syntheses,
ISBN-10: 3527311726, ed. 1, 2005, 698 s.
4. SCHNABEL, W., Polymer Degradation Principles and Practical
Applications, ISBN: 3-446-13264-3, 1981, 227 s.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Aleš Šaman


Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání bakalářské práce: **17. června 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **14. května 2015**


Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka




prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 17. června 2014

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Aleši Šamanovi za ochotu, trpělivost, odborné vedení a cenné rady při vypracování této práce. Poděkování rovněž směřuji i dalším lidem z katedry netkaných textilií.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala mým rodičům za vkládanou důvěru a neutuchající podporu během studií.

ABSTRAKT

Tato práce si kladla za cíl prostudovat vliv molekulové hmotnosti polymerů a poměru monomerů L-lactide a ϵ -caprolactone v kopolymeru PLC na výsledný produkt elektrostatického zvlákňování, potažmo rozprašování a další optimalizací parametrů roztoků a procesních podmínek během rozprašování získat vhodnou strukturu kapslí pro následnou inkorporaci PVA částic. V dalším experimentu probíhal proces inkorporace PVA za pomoci metody kombinující elektrostatické zvlákňování a rozprašování. Po úspěšném začlenění PVA částic, obarvených Fluorescein-5-isothiokyanátem, byla kompozitní struktura PLC/PVA vystavena enzymatické degradaci za použití proteinázy K. V posledním experimentu byl pozorován průběh uvolňování PVA, který byl následně vyhodnocen na základě stanovení absorbance a koncentrace barviva, vyloučeného do degradačních roztoků.

Klíčová slova: Poly(L-laktide-co- ϵ -kaprolactone), Elektrosinning, Elektrospraying, Enkapsulace, Drug Delivery System

ABSTRACT

This work aimed at studying the effect of polymers molecular weight and the ratio of monomers L-lactide and ϵ -caprolactone in copolymer PLC on the final product of electrospinning, consequently electrospraying, and at obtaining a suitable structure of capsules for the subsequent incorporation of PVA particles by further optimization of solutions parameters and process conditions during spraying. A process of PVA incorporation using the method of combining electrospinning and electrospraying took place in another experiment. After the successful incorporation of PVA particles, dyed by Fluorescein-5-isothiocyanate, the composite structure of PLC/PVA capsules was exposed to enzymatic degradation using proteinase K. In the last experiment the PVA release behavior was observed and afterwards it was evaluated by determining the absorbance and concentration of the dye, excreted into degradation solutions.

Key words: Poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone), Electrospinning, Electrospraying, Encapsulation, Drug Delivery System

OBSAH

1	Úvod.....	12
2	Teoretická část	14
2.1	Využití nanovláken a nanočástic v tkáňovém inženýrství.....	14
2.1.1	Nanovláknenné scaffoldy	15
2.1.2	Systémy cílené dopravy léčiv	15
2.1.2.1	Princip enkapsulace	16
2.1.2.2	Kvantitativní stanovení uvolňování začleněných látek	18
2.1.2.2.1	Spektrofotometrie.....	19
2.2	Elektrostatické zvlákňování.....	21
2.2.1	Princip elektrostatického zvlákňování.....	21
2.2.2	Parametry elektrostatického zvlákňování	22
2.3	Elektrospraying.....	22
2.3.1	Princip elektrostatického rozprašování.....	22
2.3.2	Parametry elektrostatického rozprašování.....	23
2.4	Alifatické polyestery.....	24
2.4.1	Syntéza alifatických polyesterů	26
2.4.1.1	Syntéza principem polykondenzace.....	26
2.4.1.2	Syntéza principem ROP	26
2.4.2	Degradace alifatických polyesterů.....	27
2.5	Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)	28
2.5.1	Syntéza PLC	28
2.5.2	Vlastnosti PLC.....	30
2.5.3	Degradace PLC.....	31
2.5.4	Aplikace PLC	32
3	Experimentální část.....	36

3.1	Příprava roztoků PLC	36
3.1.1	Elektrostatické zvlákňování PLC roztoků z jehly	38
3.1.1.1	Vliv molekulové hmotnosti a poměru monomerů PLC na výsledný produkt	39
3.1.1.2	Vliv koncentrace roztoku PLC (chloroform) na výsledný produkt	44
3.1.1.3	Vliv koncentrace roztoku PLC (CHEKO) na výsledný produkt	47
3.1.1.4	Vliv vlhkosti během elektrostatického zvlákňování PLC roztoků na výsledný produkt	50
3.2	Inkorporace PVA částic do PLC kapslí	52
3.2.1	Příprava roztoků PVA a PLC	53
3.2.1.1	Krok první - výrobu bifunkčního scaffoldu	53
3.2.1.2	Krok druhý - elektrostatické zvlákňování PLC/PVA roztoku z jehly ..	56
3.3	Studium kinetiky uvolňování začleněných PVA částic	60
3.3.1	Příprava vzorků se začleněným PVA	61
3.3.2	Enzymatická degradace	62
3.3.3	Vyhodnocení rychlosti uvolňování začleněného PVA	63
3.3.3.1	Hodinový experiment	63
3.3.3.2	Třídenní test	68
	Závěr	75
	Literatura	78

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A</i>	Absorbance [-]
<i>ASC</i>	Adult Stem Cells (dospělé kmenové buňky)
<i>b</i>	tloušťka absorpčního prostředí [m]
<i>BiSS</i>	Bismut subsalicylát
<i>c</i>	látková koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
<i>CHCl₃</i>	Chloroform
<i>CH₃COOH</i>	Kyselina octová
<i>CHEKO</i>	Rozpouštědlový systém 8:1:1 Chloroform:Ethanol:Kyselina octová
<i>CO₂</i>	Oxid uhličitý
<i>DDS</i>	Drug Delivery Systém/Systém cílené dopravy léčiv
<i>FITC</i>	Fluorescein-5-isothiokyanát
<i>H₂O</i>	Voda
<i>hm %</i>	Hmotnostní procento
<i>M_m</i>	Molární hmotnost [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
<i>P-15</i>	Polypeptid
<i>PCL</i>	Polykaprolakton
<i>PLC AP67</i>	Poly(L-lactide-co-caprolactone) s poměrem monomerů 50:50
<i>PLC AP74</i>	Poly(L-lactide-co-caprolactone) s poměrem monomerů 30:70
<i>PGA</i>	Polyglykolid
<i>PHB</i>	Polyhydroxybutyrát
<i>PLA</i>	Polylaktid
<i>PLC</i>	Poly(L-lactide-co-caprolactone)
<i>PLGA</i>	Poly(laktid-co-glykolid)

<i>PPDO</i>	Poly(p-dioxan)
<i>PURASORB 7015</i>	Poly(L-lactide-co-caprolactone) s poměrem monomerů 70:30
<i>PVA</i>	Polyvinylalkohol
<i>PVB</i>	Polyvinylbutyral
<i>Rhod</i>	Rhodamin B
<i>RH</i>	Relativní vlhkost [%]
<i>ROP</i>	Ring-Opening Polymerization
<i>SEM</i>	Rastrovací elektronová mikroskopie
<i>Sn(Oct)₂</i>	Oktoát cínatý
<i>TRIS</i>	Pufrační roztok
<i>U</i>	Elektrické napětí [V]
<i>U</i>	Specifická enzymové aktivity [U/ml]
<i>V</i>	Objem [m ³]
α	molární absorpční koeficient [1 mol ⁻¹ .cm ⁻¹]
ε	dekadický molární absorpční koeficient [1 mol ⁻¹ .cm ⁻¹]
τ	transmittance [-]
ϕ	výstupní intenzita světla [W]
ϕ_0	vstupní intenzita světla [W]

1 ÚVOD

Nanotechnologie, pro širokou veřejnost fenomén, ovšem pro vědecké pracovníky po celém světě nepřehledné množství možností pro vylepšování stávajících či výzkum a rozvoj aplikací potencionálních využívající technologii v řádech 10^{-9} m. Nepřetržitý vývoj posouvá tyto technologie velmi rychle kupředu a objevuje stále nové aplikace, které by mohly mít určitým způsobem pozitivní vliv na život člověka. Jednou z nejdiskutovanějších oblastí využití nanotechnologií jsou bezesporu medicínské aplikace, čímž se zasluhují o zvyšování úrovně poskytovaných zdravotních standardů. Velká pozornost se směřuje k vláknovým strukturám, jejichž vlákna nepřesahují průměr jednoho μm , neboť jsou hojně využívány v tkáňovém inženýrství. Další významnou aplikací je cílená doprava léčiv s řízeným uvolňováním, pro kterou se využívají částice s inkorporovanou aktivní látkou. Výhodou této technologie je uvolňování požadovaného množství léku na námi zvoleném místě, což eliminuje nežádoucí reakce a komplikace během léčby.

Tato práce se zabývá studií kopolymeru poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) za účelem jeho případného využití pro medicínské aplikace. Snahou bylo objasnit vliv molekulové hmotnosti a poměru jednotlivých monomerů na průběh elektrostatického zvlákňování/rozprašování roztoků a na strukturu výsledného produktu. S tím souviselo studium základních parametrů roztoků kopolymeru, tedy koncentrace, rozpouštědlový systém a klimatické podmínky, především vlhkost. To vše za účelem tvorby optimálních nanočástic, což bylo stěžejní pro další nedílnou část práce. Tou se stala inkorporace aktivní látky, a následná studie kinetiky uvolňování této látky.

Práce sestává ze dvou částí. První částí je teoretická, ta přibližuje důležité pojmy z oblasti nanotechnologií v medicíně, např. tkáňové inženýrství, drug delivery system, enkapsulace, uvolňování začleněných látek. Dále se zaměřuje na proces elektrostatického zvlákňování a sprejování a jejich procesní parametry. Poté jsou přiblíženy polymery spadající do skupiny alifatických polymeru a závěr řeší pak tvoří poznatky o kopolymeru PLC, které jsou uceleny do jednotlivých kapitol, jako jsou výroba, vlastnosti, degradace a využití kopolymeru. Tato část práce se stává určitou podporou pro následující experimentální část.

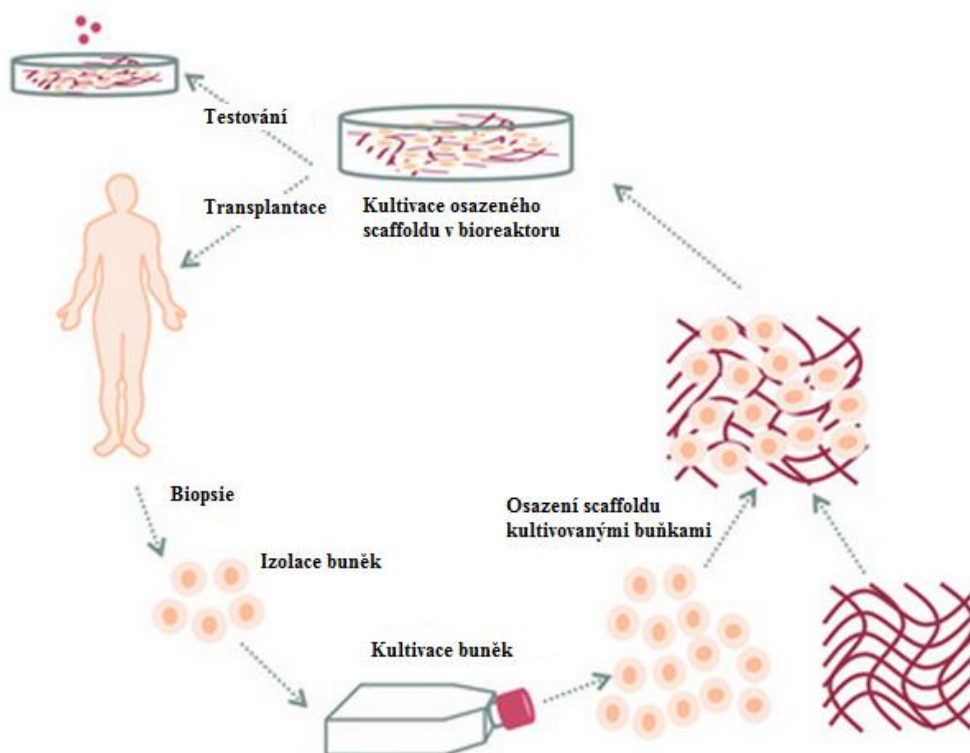
V experimentální části je pak zkoumán vliv výše popsaných parametrů roztoků na výsledný produkt (tvar, velikost, morfologii). Dále je pozornost zaměřena na inkorporaci PVA částic do PLC kapslí za pomoci metody kombinující elektrostatické zvlákňování a rozprašování. V neposlední řadě je provedena studie kinetiky uvolňování obarveného PVA během enzymatické degradace PLC/PVA kapslí stanovením absorbance barviva vyloučeného do degradačních roztoků a určením koncentrace vyloučeného barviva.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Využití nanovláken a nanočástic v tkáňovém inženýrství

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární a multidisciplinární oblast. Využívá a spojuje principy několika vědních oborů, a to biologie, chemie, fyziky a inženýrských technologií. (Ma 2004) Vhodným propojením jednotlivých vědních oblastí vytváří a napomáhá dalšímu rozvoji biologických náhrad, které zlepšují, podporují nebo zcela obnovují funkci orgánů a trojrozměrnou tvorbu tkání. (Lanza 2014)

Jak naznačuje obr 1., tkáňové inženýrství je proces, kdy dochází nejprve k návrhu vytvoření náhrady na základě pozorování pacienta, následuje odběr požadovaných buněk, zhotovení podpůrného nosiče (dále nazývaného jako scaffold), poté následuje nasazení buněk na nosič, dále dochází ke kultivaci buňkami osazeného scaffoldu a konečnou fází je implantace zpět do těla pacienta. (Ma 2004)



Obr. 1 Schéma základního principu tkáňového inženýrství.

Převzato z <http://www.git-labor.de/>

2.1.1 Nanovláknenné scaffoldy

Scaffoldy jsou trojrozměrné struktury, které v ideálním případě podporují regeneraci a růst nových buněk a poskytují jim odpovídající mechanickou oporu. (Rana 2015) Nanovláknenné scaffoldy, jak již napovídá sám název, jsou tvořeny vlákny o poloměrech menších než 1 μm , často jsou tímto názvem označovány i scaffoldy, jejich poloměry dosahují i desítek μm . Nosiče je možné připravovat za pomoci dalších metod – tvorbou hydrogelu síťováním, vysoušením mrazem, zpěňováním, loužením solí atd.

Za účelem dokonalé funkce podpůrného nosiče jsou na scaffoldy kladeny následující požadavky. Jeden z hlavních požadavků je vysoká pórovitost, vhodná velikost pórů a velký specifický povrch, což usnadňuje uchycení a následnou proliferaci buněk. To je zajištěno užitím právě nanovláknenných struktur. Dalším požadavkem je biokompatibilita a hlavně biodegradabilita. Též musí být nosiče pro buňky zcela netoxické. Neméně důležitým parametrem, na který je kladen důraz, je rychlost degradace polymerního scaffoldu. Ta by měla odpovídat rychlosti obnovy nových tkání a nosič by měl být odbouráván pozvolna. Scaffoldy musí vykazovat dostatečnou mechanickou odolnost a pevnost, což je důležité pro zachování předem definovaného tvaru a struktury nově vznikající tkáně. V neposlední řadě by měly scaffoldy vykazovat pozitivní interakci s osazenými buňkami, tedy zvýšenou adhezi k buňkám, podporovat růst a migraci buněk. (Ma 2004)

Pro výrobu nanovláknenných scaffoldů se v současné době nejvíce využívá alifatických polyesterů. Mezi nejvýznamnější patří PGA, PLA, PLGA, PCL, PHB a další. (Ma 2004)

2.1.2 Systémy cílené dopravy léčiv

V literatuře se spíše setkáme s pojmem „Drug delivery systems“ (dále DDS). Vývoj těchto systémů začal na základě určité nedokonalosti konvenční léčby orálními léčivy, ve smyslu poskytování prostorově či časově řízeného uvolňování léčivých složek, což je hlavním problémem nespočtu vedlejších účinků. Konvenční aplikace léků je charakterizována omezenou účinností, nevhodnou distribucí a nedostatečnou selektivitou. Tato omezení však byla překonána s použitím DDS, protože právě tyto systémy přepravují léky na požadované místo, minimalizují neblahé vlivy a nežádoucí

účinky působící na okolní tkáň. Kromě toho DDS chrání lék před příliš rychlým uvolněním léčiva, což podstatně zvyšuje léčebné účinky. (Wilczewska, 2012) Mimo to, jak uvádí Bock (2012), jsou tyto systémy schopné poskytovat působení léčiv po delší dobu, v řádech několika hodin až měsíců, postupnou degradací polymeru, v němž je léčivo určitým způsobem zapouzdřeno.

Využitím nanočástic pro cílenou dopravu léčiv se ve své práci zabývá Singh (2009). Uvádí, že pro „drug delivery systém“ je využíváno nanočástic o velikosti od 10 nm do 1 μm. Ovšem může se jednat i o větší částice o poloměrech až 10 μm. Velikost a tvar částic se samozřejmě uzpůsobují požadované aplikaci.

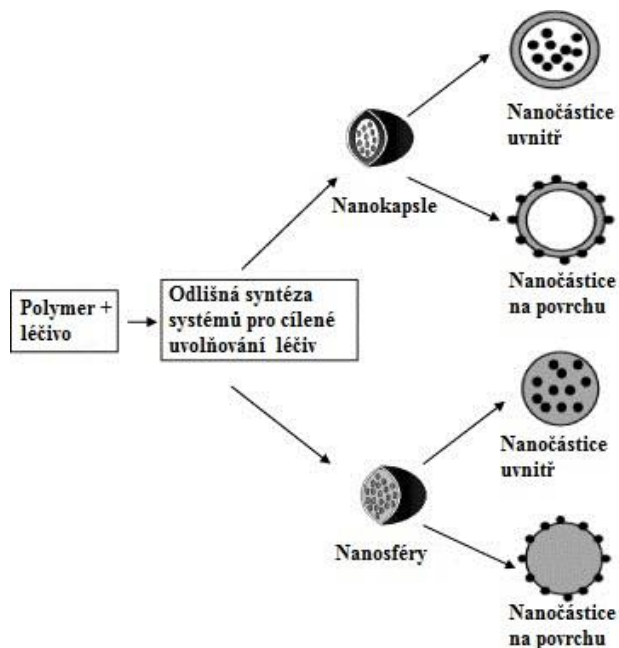
Vývoji a testování nano-léčiv z biokompatibilních a biologicky odbouratelných polymerů se ve své studii věnuje Kumari a kol. (2010). Tato práce poskytuje přehled odlišných syntéz a zapouzdřování různých druhů léčiv do několika druhů biologicky odbouratelných nosičů (PLGA, PLA, PCL, chitosan, želatina). Podobnou problematikou se zabývá i Naahidi (2013). Též dává přehled o inkorporaci několika typů nanočástic jakožto léčiv do polymerních matic. Ve své práci dále objasňuje pojmy biokompatibilita, interakce s krví a biodegradabilita nano-léčiv.

2.1.2.1 Princip enkapsulace

Enkapsulace je technologie využívající začleňování různých látek (pevných látek, kapalin, léků, bakteriálních a kmenových buněk) do nitra či na povrch nosného média. Lze zapouzdřovat mikročástice (mikroenkapsulace) nebo nanočástice (nanoenkapsulace). Obě technologie představují významný vliv na poli bioterapeutických aplikací, slouží hlavně k torbě DDS. (Tomaro-Duchesneau 2013)

V současné době se nanoenkapsulací zabývá nespočet vědeckých týmů po celém světě. V nanomedicině jsou nanočástice obecně definovány jako pevné, submikronové až mikronové nosiče léčiv, přičemž termín nanočástice je společným pro všechny typy nosičů. Jedny ze způsobů zapouzdření biologicky odbouratelných léčiv zachycuje obr. 2, který naznačuje dva typy strukturálního uspořádání nanočástic v polymerní matici. Schematicky naznačuje tvorbu nanokapslí a nanosfér, kdy jsou částice inkorporovány uvnitř nebo ukotveny na povrchu nosičů.

Nanosféra má vždy strukturu matrice a léčiva jsou absorbována na povrchu či zapouzdřena uvnitř matrice. Začlenění v matrici znamená, že inkorporované látky jsou vázány přímo v řetězci polymeru tvořícího obal. Zatímco nanokapsle jsou vezikulární systémy, ve kterých je léčivo uzavřeno uvnitř dutiny, tím se vytvoří jádro, které je obaleno polymerní membránou. (Reis 2005)



Obr. 2 Schématické zobrazení tvorby nanokapslí a nanosfér.

Převzato z (Kumari 2010)

Zapouzdřování nanočástic lze provádět třemi metodami, fyzikální, chemickou a polymerační metodou. Fyzikální metoda zahrnuje tvorbu nanočástic procesem potahování (Pan coating, Air-suspension coating), odstředivým vytlačováním, procesem koacervace nebo principem Spray-Drying. Chemická metoda umožňuje tvorbu nanočástic odpařováním rozpouštědla z roztoku látky následně tvořící obal kapsle. Do polymerační metody spadá tvorba částic vlivem mezifázové polymerace, In situ polymerace a matrix polymerace. (Shekhar 2010) Těmito metodami lze připravit celou řadu nano/mikročástic, částice ve formě jádro/plášť, vícestěnné nebo multijaderné částice, částice s iregulárním tvarem a další.

Odlišné vlastnosti a charakteristiky chování i uvolňování léčiva při jeho cílené doprava je závislá na způsobu přípravy nosiče, výsledném strukturálním uspořádání nanočástic v matrici a samozřejmě na typu zapouzdřovaných nanočástic. (Singh 2009)

Wilczewska (2012) ve své studii uvádí přehled vybraných druhů nano-nosičů, které jsou též testovány. Jako nosiče léčiv používají liposomy, pevné peptidové částice, polymerní částice v podobě PCL, polyakrylamid, přírodní polymery, chitosan, želatinu a dále, silikonové, uhlíkové či magnetické materiály.

DDS vytvořené tímto způsobem musí splňovat podmínku biokompatibility, neměly by působit toxicky, způsobovat alergické reakce či působit zánětlivě. Dále by měly splňovat podmínku biodegradability, čímž je zajištěno řízené uvolňování léčivých složek na cíleném místě. K degradaci dochází štěpením kovalentních vazeb, působením biochemických faktorů lidského organismu. Jong (2008) se ve své práci zabývá právě toxikologickými aspekty DDS se zapouzdřenými nanočásticemi a upozorňuje na možné nebezpečí, které představují. Zároveň však nevyvrací jejich obrovský potenciál. Ve své studii dává přehled o běžně využívaných systémech pro podávání léčiv. Mimo jiné svůj výzkum směřuje k otázkám, jak dále posouvat hodnocení bezpečnosti nanočástic využívaných v DDS.

2.1.2.2 Kvantitativní stanovení uvolňování začleněných látek

Navzdory rychlému a rozsáhlému rozvoji nosičů s inkorporovanými aktivními látkami schopných řízené dopravy, zůstává oblast procesu uvolňování těchto látek ne zcela uspokojivě pochopena. Přičemž pro další rozvoj a vylepšení technologií DDS je právě proces a kinetika uvolňování začleněných léčiv stěžejní.

Hlavním cílem při studiu uvolňování aktivních látek je stanovit množství a rychlost uvolňování těchto látek. K tomu slouží celá řada metod, kterými se dá tato problematika zjišťovat. Jednou z možností je kvantitativní chemická analýza, která má za úkol stanovit množství složek určité látky. Lze ji rozčlenit do dvou skupin, metody chemické a fyzikální. Metody chemické jsou založeny na chemické reakci zjišťované látky a vhodného činidla, tím je určovaná látka převedena ve stálou a přesně definovanou sloučeninu. Tyto metody lze rozdělit na analýzu vážkovou a odměrnou (volumetrie a titrace). Metody fyzikální jsou potom založeny na stanovení určitých

fyzikálních vlastností látek, kdy lze matematicky vyjádřit vztah mezi fyzikálními vlastnostmi a množstvím látek. Sem spadají metody založené na absorbanci či odrazu světla vlivem průchodu světelného paprsku zkoumaným roztokem, jako jsou např. fotometrie a kolorimetrie. Dále sem patří metody odvozené od excitace sekundárního záření – fluorescenční a fosforescenční postupy. V neposlední řadě jsou to metody založené na rozkladu světla za současné absorpce viditelného, ultrafialového a infračerveného záření, nazývané spektrofotometrie. (Tomíček 1958)

2.1.2.2.1 Spektrofotometrie

Pro stanovení obsahu určité barevné látky v roztoku respektive ke stanovení její koncentrace v roztoku se běžně a často využívá spektrofotometrie. Metoda, jejímž principem je to, že každá sloučenina absorbuje nebo propouští světlo v určitém rozsahu vlnových délek. Podmínkou spektrofotometrického stanovení je možnost uvedení barevné látky do roztoku a jedná-li se o stanovení ve viditelné oblasti, je nutné, aby určovaná látka byla barevná, prostředí, kterým bude procházet světlo, bylo průhledné, a aby selektivní absorpce světla v roztoku průchodem neměnila vlnovou délku, ale pouze intenzitu. (Kříženecká, Synek 2014)

Spektrofotometr je nástroj, který měří množství fotonů (intenzity světla) pohlcených při průchodu roztoku vzorku. Dle rozsahu vlnové délky světelného zdroje je možné rozdělit spektrofotometry na dva typy: UV-viditelné spektrofotometry a IR spektrofotometry. Spektrofotometr se skládá ze zdroje světla, kolimátorů, monochromátoru, voliče vlnové délky, kyvety a fotoelektrického detektoru a počítače (případně digitálního displeje). Obecně jsou nejdůležitějšími částmi spektrometr a fotometr. Spektrometr poskytuje požadovaný rozsah vlnové délky světla, přičemž kolimátor (čočka) vysílá přímý paprsek světla (fotonů), který projde monochromátorem, který tento paprsek rozdělí do několika dílčích vlnových délek. Následně volič vlnové délky (štěrba) přenáší pouze požadované vlnové délky. Následně požadovaný rozsah vlnových délek prochází roztokem vzorku umístěného v kyvetě. Fotometr pak detekuje množství fotonů absorbovaných průchodem, nakonec vyšle signál do počítače, který provede vyhodnocení. Spektrofotometrie využívá Lambert-Beerova zákona, ten určuje absorbanci. Ta je závislá na celkovém počtu absorbujících částic interagujících se svazkem paprsků, tloušťce absorbujícího prostředí, kterým prochází záření. Je také přímo úměrná koncentraci roztoku. (Kříženecká, Synek 2014)

Pro konečnou tloušťku absorbující vrstvy platí

$$\phi = \phi_0 e^{-\alpha b} \quad (1)$$

kde ϕ je výstupní intenzita světla, ϕ_0 je vstupní intenzita světla, α je absorpční molární koeficient, b je tloušťka absorpčního prostředí.

Nebo lze užít vztahu

$$\tau = \frac{\phi}{\phi_0} = e^{-\alpha b} = 10^{-\varepsilon b} \quad (2)$$

kde τ je transmittance, ϕ je výstupní intenzita světla, ϕ_0 je vstupní intenzita světla, α je absorpční molární koeficient, b je tloušťka absorpčního prostředí a ε je dekadický molární absorpční koeficient.

Absorbance je poté dána následujícím vztahem

$$A = -\log \frac{\phi}{\phi_0} = -\log \tau = \varepsilon b c \quad (3)$$

kde A je absorbance, τ je transmittance, ϕ je výstupní intenzita světla, ϕ_0 je vstupní intenzita světla, α je absorpční molární koeficient, b je tloušťka absorpčního prostředí, ε je dekadický molární absorpční koeficient c látková koncentrace. (Kříženecká, Synek 2014)

Spektrofotometrie je pro stanovování uvolňování inkorporovaných látek poměrně využívaná a pro vyhodnocování byla použita v široké řadě studií a experimentů. Je to dáno její rychlostí a poměrně velkou přesností. Navíc ji lze využít i v případě určování látky, jejíž koncentrace v roztoku je velice malá. Analýzu kinetiky uvolňování léčiva z očních terapeutických systémů za pomoci spektrofotometru ve své studii předkládá Tieppo (2014). Tato studie potvrdila, že nejdůležitějším parametrem na uvolňování léčiv jsou podmínky uvolňování, těmi byly objemy nosných systémů, ze kterých se léčiva uvolňovala, teplota a rychlost otáček při testování. Studie potvrdila, že systémy o malých objemech vykazují velmi malé uvolňování. Studium řízeného uvolňování titanocendichloridu z hybridního PLC/fibroinového scaffoldu, jakožto potenciálního chemoterapeutického implantátu proti karcinomu prsu, se zabývá studie

Laiva (2015). Analýza uvolňování byla opět provedena pomocí spektrofotometru a hodnoty koncentrace v daných časových intervalech byly stanoveny z lineární závislosti koncentrace s absorbancí. Studie prokázala, že množství uvolněného léčiva dosáhla svého maxima šestý den. Dále se prokázaly pozoruhodné vlastnosti uvolňovaného titanocendichloridu, neboť nádorové buňky vykazovaly apoptózu. Karuppuswamy (2015) přináší poznatky o řízeném uvolňování tetracyklin hydrochloridu z PCL nanonovlákných membrán. Spektrofotometrická analýza ukázala, že po počátečním prudkém uvolnění docházelo k pozvolnému a rovnoměrnému uvolňování léčiva až to osmého dne, což je pro PLC membrány poměrně dlouhá doba, a proto se tyto membrány stávají slibnými potencionálními nosiči léčiv v biomedicině.

2.2 Elektrostatické zvlákňování

Způsob použití elektrostatických sil pro tvorbu velmi jemných vláken je znám již více než 100 let. Elektrostatické zvlákňování se ukázalo jako poměrně jednoduchá metoda pro vytvoření submikronových vláken, zpravidla o průměrech pohybujících se mezi 100 nm až 1 μ m. Není však výjimkou, že vlákna dosahují průměrů i několika μ m. Nanovláknenné struktury se vyznačují velkým specifickým povrchem, vysokou pórovitostí, ovšem s malou velikostí pórů, což tyto materiály staví do popředí obrovského zájmu pro nespočet aplikací. Touto metodou lze připravit vlákna z různých polymerů, přírodních, syntetických i polymerů obsahující nejrůznější příměsi v závislosti na použití a požadovaných vlastnostech. (Haighi 2012).

2.2.1 Princip elektrostatického zvlákňování

Princip elektrostatického zvlákňování (electrospinningu) využívá rozdílného elektrického potenciálu mezi polymerním roztokem/taveninou a sběrným kolektorem. Použitím zdroje vysokého napětí dochází k vhnění náboje určité polarity do polymerního roztoku či taveniny, ty jsou následně přitahovány vlivem elektrického potenciálu vznikajícího mezi kapilárou a kolektorem. Odlišný elektrický potenciál způsobuje silnou přitažlivost mezi kapalinou a kolektorem a vlivem elektrostatických odpuzivých sil mezi stejně nabitými částicemi kapaliny dochází k deformaci kapaliny a tvorbě Taylorova kužele. V okamžiku, kdy je překonána prahová hodnota napětí, elektrostatické síly překonají povrchové napětí kapičky polymeru a jeden nebo dva nabitě proudy kapaliny jsou vytahovány z Taylorova kužele. Tyto vláknenné proudy

prochází atmosférou, což umožňuje odpaření rozpouštědla a následné ukládání pevných polymerních vláken na kolektor. (Sill 2008), (Hu 2014)

2.2.2 Parametry elektrostatického zvlákňování

Parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování lze rozdělit do tří skupin. První skupinou jsou parametry polymeru (roztoku či taveniny). Ty zahrnují viskozitu, koncentraci polymeru, molekulovou hmotnost polymeru, povrchové napětí a vodivost. Druhou skupinou jsou procesní parametry, do této kategorie spadá napětí, typ kolektoru a vzdálenost mezi kolektorem a kapilárou. A třetí skupinou jsou parametry dané okolními podmínkami, tedy teplota, vlhkost, rychlost proudění vzduchu. Přehled parametrů a jejich vliv na elektrostatické zvlákňování poskytuje kniha prof. Li a prof. Wanga (2013), popisují zde jednotlivé parametry, jejichž změnou lze docílit odlišných morfologií, struktur a jemností vláken. Podstatné je, že parametry procesu elektrostatického zvlákňování jsou podrobně zkoumány pro jednotlivé polymery samostatně, neboť každý polymer se chová zcela odlišně. Proto je nutné procesy elektrospinningu pro každou polymerní látku vždy optimalizovat. (Hu 2014)

2.3 Elektrospraying

Elektrospraying, neboli elektrohydrodynamické rozprašování, je způsob rozprašování kapaliny pomocí elektrických sil. Metoda je založená na stejném principu jako electrospinning, nedochází ovšem k tvorbě vláken, ale k tvorbě nano či mikro částic. Systém elektrosprayingu skýtá řadu výhod oproti mechanickým rozprašovačům. Jednou z nich je velikost kapek, dále pak úzká distribuce kapek. V důsledku těchto vlastností je electrospaying považován za perspektivní technologii, která najde uplatnění v mnoha aplikacích. V současnosti se výzkum nejvíce upírá k oblasti cílené dopravy léčiv. (Jaworek 2008)

2.3.1 Princip elektrostatického rozprašování

Jak je zmíněno výše, princip elektrostatického rozprašování je obdobný jako u elektrostatického zvlákňování. Opět dochází vlivem elektrického pole k deformaci polokulovitěho tvaru kapky zavěšené na konci kapiláry do kónického útvaru. Tato deformace způsobí vyrovnaní odpuzujících sil vlivem stejného náboje působícího na povrchu kapky a vlivem povrchového napětí kapaliny. Ve chvíli, kdy je dosaženo

kritického bodu napětí, je překonáno povrchové napětí a z Taylorova kužele je vypuzen stabilní proud kapaliny. Tento proud se ovšem ihned dělí na jednotlivé submikronové kapičky (nejčastěji o velikosti desítek nanometrů až několik mikrometrů), které následně dopadají na kolektor. Rozpad proudu je způsoben v důsledku Plateau-Rayleigh nestability, přičemž tento jev je především funkcí povrchového napětí kapaliny, které je vlivem nízké viskozity polymeru příliš velké k tvorbě vláken. (Růžicková 2006)

2.3.2 Parametry elektrostatického rozprašování

Stejně jako tomu bylo u electrospinningu, velikost, tvar a strukturu vznikajících částic ovlivňují zásadním způsobem parametry vztažené k danému typu polymeru, proces rozprašování a okolní podmínky.

Hlavním parametrem a předpokladem reprodukovatelnosti elektrostatického rozprašování a výroby monodisperzních částic je zajistit stabilní režim proudu při vytahování z Taylorova kužele. To lze zajistit optimalizací a přizpůsobením napětím, vodivostí a rychlostí průtoku polymeru skrze kapiláru. Dalším důležitým parametrem je elektrická vodivost, jejíž změnou lze docílit odlišné velikosti částic. Je potvrzeno, že rostoucí elektrická vodivost vede k poklesu velikosti částic. (Bock 2012) Parametry, které jdou ruku v ruce s výše uvedenými parametry a značně se podílí na průběhu procesu a výsledcích elektrostatického rozprašování jsou viskozita a molekulová hmotnost polymeru. S tím samozřejmě souvisí i koncentrace roztoku, neboť se vzrůstající koncentrací vzrůstá i viskozita. Pro proces elektrosprayingu je žádoucí nízká viskozita polymeru ($\eta < 1$ poise), jinak dochází k tvorbě vláken. (Růžicková 2006)

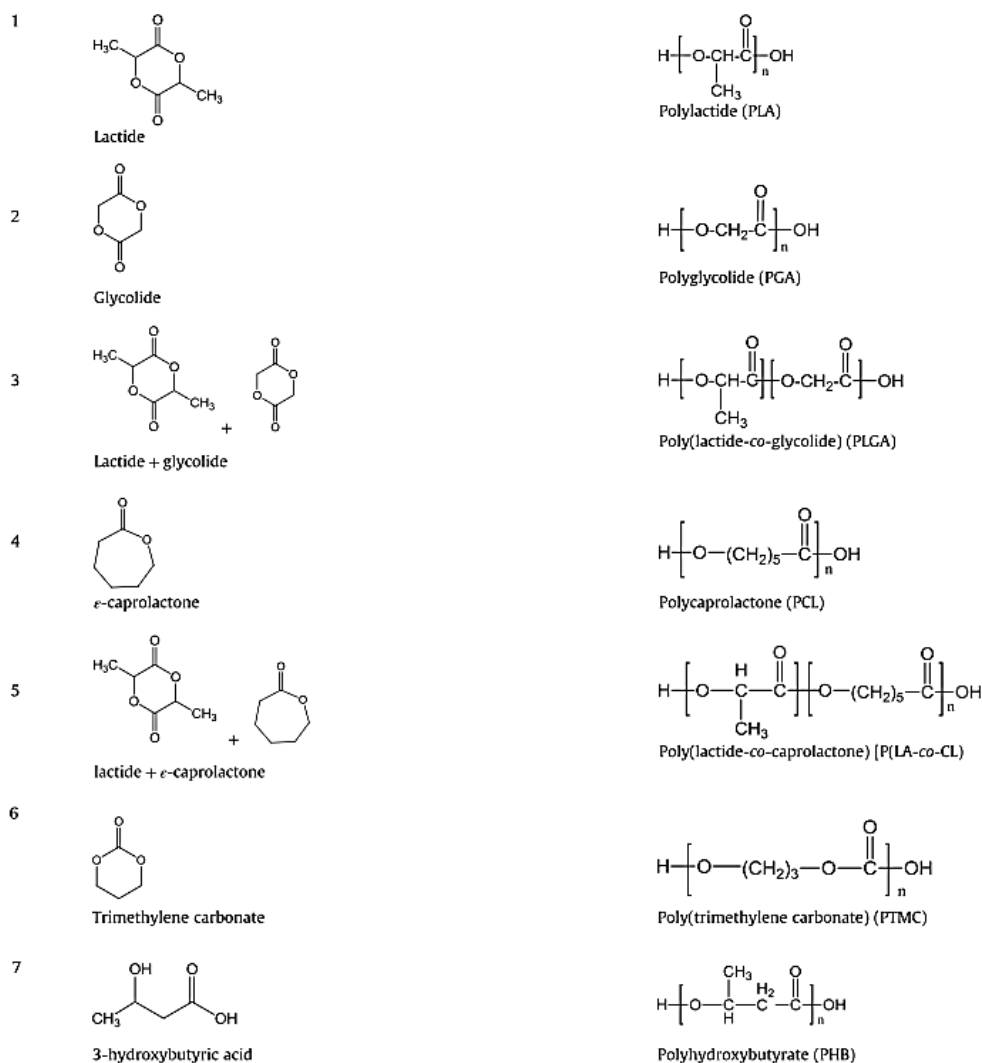
Morfologie a velikost části může být dále ovlivněna průměrem kapiláry, vzdáleností konce kapiláry od kolektoru a zvoleným napětím či druhem rozpouštědla. Průměr kapiláry má vliv hlavně na výslednou velikost dopadajících kapek na kolektor. Vzdálenost kolektoru od jehly způsobuje především morfologické změny. Samozřejmě závisí i na ostatních aspektech, ale obecně je známo, že je-li vzdálenost příliš malá, rozpouštědlo nemá dostatek času na odpaření z polymerních kapiček a výsledkem může být například zborcení sférické struktury dopadajících částíček. Druh rozpouštědla má též vliv na výslednou morfologii, povětšinou způsobuje nejružnější deformace a narušení sférického tvaru kapek. (Bock 2012)

I zde je důležitá optimalizace procesu elektrostatického rozprašování, protože každý polymer je odlišný (z hlediska struktury molekuly, molekulové hmotnosti, koncentrace, viskozity atd.) a vyžaduje tedy i odlišné procesní parametry.

2.4 Alifatické polyestery

Alifatické polyestery $[-O-R-CO]-$ s jednou esterovou skupinou $-COO-$ a alifatickou skupinou na jednotku $-R-$ jsou velice rozsáhlou třídou biologicky odbouratelných polymerů. Právě díky své biodegradabilitě, rozmanitosti a syntetické všestrannosti dostaly do popředí zájmu a jsou předmětem mnoha výzkumů a studií. (Vroman 2009), (Elias 2005) Představují zajímavou alternativu k syntetickým biologicky nerozložitelným polymerům pro širokou škálu aplikací krátkodobé životnosti. Alifatické polymery jsou biopolymery, jejichž strukturu tvoří opakující se monomerní jednotky vázané pomocí esterových vazeb. Mnoho takovýchto esterů se vyskytuje v přírodě, stejně tak i enzymy, které je degradují. Nicméně odbouratelné jsou i estery vznikající synteticky. Jejich další značnou výhodou je fakt, že téměř všechny monomery používající se k jejich přípravě je možné vyrobit z monomerů získaných z obnovitelných zdrojů. (Bikiaris 2013)

Mezi nejvýznamnější zástupce alifatických polyesterů patří PGA, PLA, PLGA, PCL, PHB, PPDO, PTMC a v neposlední řadě PLC, v současné době jeden z nejzkoumanějších polymerů spadající do této skupiny. (Vroman 2009) Obr. 3 zachycuje přehled monomerů a z nich vznikající příslušné alifatické polyestery.



Obr. 3 Monomery a chemické struktury nejvýznamnějších alifatických polymerů

Převzato z: (Bikiaris 2013)

Jak již bylo zmíněno, alifatické polyestery jsou využitelné pro řadu aplikací, např. jako obalové materiály, mulčovací fólie, používané ve snaze zlepšit problémy týkající se hromadění konvenčních plastů. Obrovský význam představují hlavně na poli biomateriálů pro tkáňové inženýrství, systémy cílené dopravy léčiv či implantáty. To je dáno jejich biokompatibilitou. Jérôme (2008) ve své studii zmiňuje, že nepoužívanějšími polyestery pro DDS jsou PLA a PLGA, vzhledem k jejich poměrně rychlému a nastavitelnému tempu rozkladu. Dále se zmiňuje o prudkém nárůstu počtu patentů v této oblasti od počátku 90. let.

2.4.1 Syntéza alifatických polyesterů

Alifatické polyestery mohou být připraveny několika způsoby. Avšak nejčastěji jsou syntetizovány vícestupňovou polymerizací nebo polykondenzací a polymerizací za otevření kruhu (ROP). (Elias 2005)

2.4.1.1 Syntéza principem polykondenzace

Princip polykondenzace se opírá o kondenzaci hydroxykyselin či směsí dikyselin a diolů. Hlavní nevýhodou tohoto mechanismu jsou vysoké teploty a dlouhé reakční časy potřebné k tvorbě polyesterů. To je ku prospěchu vedlejším reakcím, ovšem s negativním účinkem na molekulové hmotnosti polymerů. Určitým omezením této reakce je nutnost odstranit vodu z polymeračního média pro zvýšení konverze a molekulové hmotnosti. (Jerôme 2008)

2.4.1.2 Syntéza principem ROP

Polymerace laktidů a laktonů za otevření kruhu (neboli ring-opening polymerization) je bez výše uvedených omezení a je tedy pro syntézu polyesterů vhodnější. Z laktonů, o různé velikosti kruhu (nejčastěji však šesti až sedmičlenných), substituovaných či bez funkčních skupin, je možné snadno připravit polyestery o vysoké molekulové hmotnosti. A touto metodou lze dosáhnout předem definovaných vlastností. (Vroman 2009)

Pro ROP je využíváno široké škály aniontových, kationtových a koordinačních iniciátorů či katalyzátorů. Iontové iniciátory jsou vždy reaktivnější, u polyesterů jsou zodpovědné za snížení molekulových hmotností s širší distribucí molekulové hmotnosti polymeru. Ideálnější případem ROP laktonů a laktidů je živý/řízený proces, který vede k polyestěrům o vysokých molekulových hmotnostech s úzkou distribucí molekulových hmotností. Jerôme (2008) ve své práci uvádí přesné syntézy metodou ROP pomocí nepoužívanějších iniciátorů/katalyzátorů na bázi kovu, kterými jsou hliníkové alkoxidy, oktoát cínčitý, biologicky vstřebatelné soli či deriváty vzácných zemin.

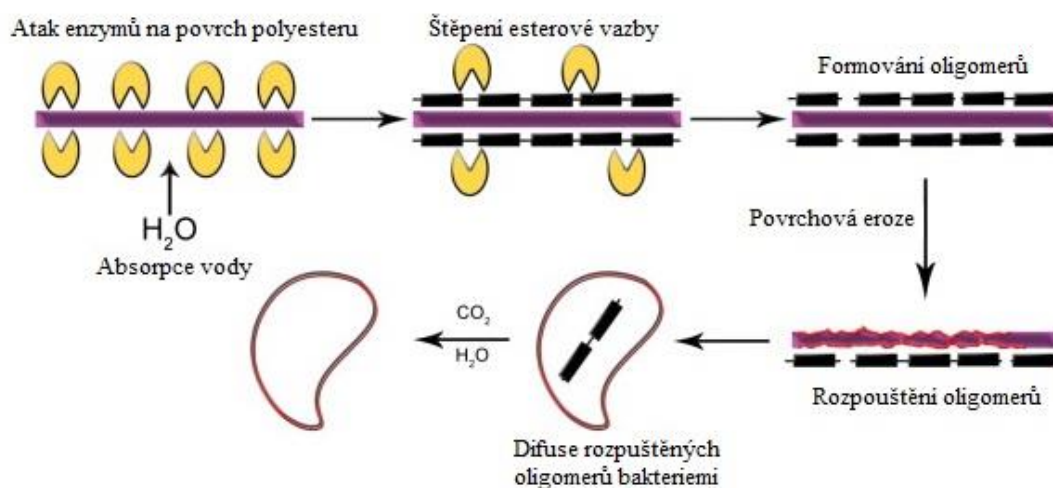
ROP probíhá hlavně prostřednictvím dvou hlavních polymeračních mechanismů, v závislosti na použitých organokovových sloučeninách. Některé z nich působí jako katalyzátory, nejprve aktivují monomer tvorbou komplexů s karbonylovou

skupinou. Polymerizace je následně iniciována jakýmkoli nukleofilem např. vodou, alkoholem či nečistotami obsaženými v polymeračním prostředí nebo sloučeninami přidanými záměrně. V druhém případě organokovové sloučeniny zastupují iniciátor reakce a polymerizace probíhá koordinačním mechanismem. Typickými iniciátory jsou alkokxydy kovů. (Jerôme 2008)

Jerôme (2008) ve své studii, kromě výše popsaných principů syntézy, uvádí i méně známe postupy syntézy polyesterů, jako jsou enzymatická polymerizace, ROP bez kovů jakožto iniciátorů, syntéza s využitím superkritického CO_2 .

2.4.2 Degradace alifatických polyesterů

Degradace alifatických polyesterů probíhá jedním nebo několika mechanismy. Vlivem chemické hydrolýzy, mikrobiální, enzymatické a tepelné degradace. Velmi účinnými degradačními enzymy jsou lipázy. V důsledku hydrolýzy vlivem enzymů dochází ke štěpení polymerního řetězce a tvorbě oligomerů, ty jsou dále štěpeny pomocí enzymů a reakce je následně zakončena úplným rozpuštěním a přeměnou oligomerů v H_2O a CO_2 . Mechanismus enzymatické degradace zachycuje obr. 4.



Obr. 4 Schéma enzymatické hydrolýzy alifatických polyesterů.

Převzato z: (Bikiaris 2013)

Tento postup enzymatické degradace je proces, který je ovlivněn řadou faktorů. Podstatnou roli hraje struktura a další chemické a fyzikální vlastnosti polyesterů

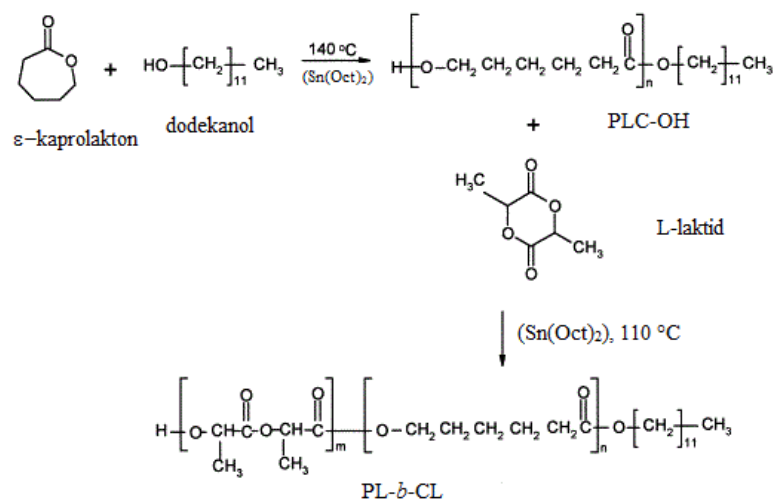
(orientace řetězce, chemické složení, molekulová hmotnost, distribuce molekulové hmotnosti, krystalinita, teplota tání a skelného přechodu, přítomnost postranních řetězců, přítomnost zbytkových monomerů či oligomerů). Naprosto stejnou váhu mají okolní podmínky (vlhkost, teplota, pH, obsah solí, přítomnost či nepřítomnost kyslíku, množství živin). (Bikiaris 2013)

2.5 Paly(L-lactide-co-ε-caprolactone)

PLC je další ze zástupců alifatických polyesterů. Jedná se o kopolymer, který je vytvořen z monomerů L-laktidu a ε-kaprolaktonu. Výsledkem syntézy zmíněných monomerních jednotek, je biodegradabilní a biokompatibilní kopolymer, jehož molekulová hmotnost, mechanické i fyzikální vlastnosti jsou závislé na předem zvoleném poměru monomerů (nejčastěji 50:50, 70:30, 75:25, 90:10, 10:90). To je obrovskou výhodou a PLC se tak stává vhodným kandidátem pro širokou škálu aplikací. Nemalá pozornost je soustředěna na využití tohoto kopolymeru především v medicíně a tkáňovém inženýrství. Vědecké týmy napříč světem provádějí studie a zkoumají PLC ze všech možných úhlů, jeho syntézu, biokompatibilitu, degradaci, vlastnosti a podávají zprávy o jeho možném využití.

2.5.1 Syntéza PLC

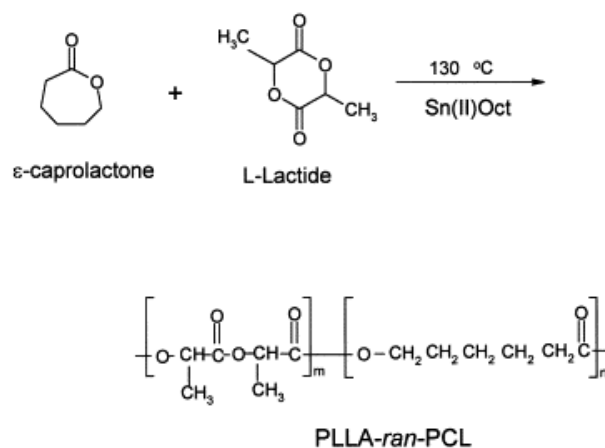
PLC je běžně syntetizován polymerizací za otevření kruhu, přičemž podmínky a postup přípravy se mohou značně lišit. Kim (2001) ve své studii uvádí dva typy syntézy PLC. První je tvorba blokového kopolymeru PL-*b*-CL, kterou zachycuje obr. 5. V tomto případě nejprve dochází k reakci ε-kaprolaktonu a dodekanolu v přítomnosti oktoátu cínatého ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) při teplotě 140 °C po dobu 24 hodin. To vede k tvorbě PCL zakončeného hydroxylovou skupinou –OH. Tento vzniklý PCL-OH se následně použije k iniciaci L-laktidu opět za přítomnosti ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) při teplotě 110 °C po dobu 48 hodin, čímž za otevření kruhu dochází k tvorbě PL-*b*-CL.



Obr. 5 Schéma popisující syntézu blokového PLC

Převzato z: (Kim 2001)

Druhou variantou je příprava statického kopolymeru PLC, jak znázorňuje obr 6. Tato metoda spočívá v přidání obou monomerů (PLA i PCL) v předem určeném množství do reaktoru, kdy v přítomnosti Sn(Oct)_2 probíhá reakce při teplotě $130\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 48 hodin. Tato syntéza je používána zdaleka nejčastěji a je uvedena v několika dalších studiích např. (Jeong 2004), (Zhu 2006), (Lee 2008), (Jang 2012), (Jalonek 2013), (Samberg 2014), které nebyly zaměřeny pouze na syntézu PLC.



Obr 6 Schéma popisující syntézu statického PLC

Převzato z: (Kim 2001)

Po reakcích se kopolymery (blokový i statický) rozpustí v chloroformu a následně vysráží pomocí směsi acetonu a n-hexanu (či methanolu). Tento proces se provádí za účelem izolace kopolymerů, odstranění zbytků iniciátoru a nezreagovaných monomerů, případně dalších nečistot. (Kim 2001)

Fernandéz (2012) ve své práci také volí výše uvedenou druhou metodu. Syntézu PLCFITC provádí při různých teplotách (120, 130, 140, 150 °C) a různých poměrech monomerů PLA a PCL (90:10, 80:20, 75:25 a 70:30). Následně pozoruje výtěžky jednotlivých reakcí a molekulové hmotnosti kopolymerů. Jako optimální teplotu polymerizace stanovuje rozmezí 130 až 140 °C, kdy konverze kopolymerů je kolem 90% a molekulové hmotnosti se pohybují mezi 133 000 a 226 000 g·mol⁻¹. Ve své další studii Fernandéz (2013) se opět zaměřuje na optimalizaci podmínek polymerizace (teplota, doba reakce a molární poměr komonomer/katalyzátor) PLC statických kopolymerů. Pro syntézy je použito katalyzátorů (Sn(Oct)₂) a BiSS, kdy mechanismy obou katalyzátorů se liší v koordinaci a aktivaci monomeru, což vede k různým řetězcům kopolymeru.

2.5.2 Vlastnosti PLC

Typ syntézy PLC, podmínky přípravy kopolymeru a podíl monomerů L-laktidu ku ε-kaprolantonu, tedy parametry, které lze libovolně měnit, poskytují výhodný způsob, jak docílit výrazně odlišných kopolymerů z hlediska mechanických i fyzikálních vlastností, biokompatibility, možností a rychlosti biologického rozkladu. Právě tyto vlastnosti následně rozhodují o možném uplatnění ve vybraných aplikacích, které kladou na kopolymer PLC odlišné požadavky.

Zásadní vliv na vlastnosti PLC má poměr jednotlivých monomerních jednotek tvořících výsledný kopolymer. U obou monomerů se jedná o termoplasty s poměrně pomalou degradací, která se ovšem jejich poměrem dá upravit. I přesto mají rozdílné vlastnosti, proto se s rostoucím podílem jednoho z nich i vlastnosti PLC podobají více vlastnostem převažujícího monomeru. PLA, přesněji jeho L-forma (PLLA) je poněkud méně tvárný a tužší polymer (při tělesné teplotě je ve sklovitém stavu) s poměrně vysokým stupněm krystalinity a pomalou degradací. Kdežto PCL je velice tvárný polymer s nízkou tuhostí (při tělesné teplotě v kaučukovitém stavu) a oproti PLA

degraduje daleko rychleji. Podílem jednotlivých monomerů tedy lze poměrně snadno upravovat vlastnosti kopolymeru PLC. (Viera 2010) Rozdílnost mechanických vlastností v závislosti na typu kopolymeru PLC (70:30, 50:50, 30:70) dokládá studie Kwona (2005) viz obr. 7. Podobné výsledky ve svých studiích přináší i Fernández (2012), Lee (2008), a Saha (2006).

Podíl monomerů laktidu a kaprolaktonu se společně s dalšími aspekty odráží v molekulové hmotnosti, teplotě skelného přechodu, teplotě tání, podílu krystalické fáze, polydisperzity, mechanické pevnosti, počátečním modulu, elasticitě, protažení a rychlosti degradace, což je spojeno s rychlostí uvolňování možných začleněných látek. V případě zvlákňování či sprayování samozřejmě i morfologii vláken, vlákenných struktur a vytvořených útvarů. (Viera 2010)

Polymer	Poměr monomerů LL:CL	Molekulová hmotnost		Fyzický stav při 25 °C
		Mn	Mw/Mn	
PLL	100:0	4.5×10^5	1.3	Pevná látka
PLCL 70/30	70:30	2.0×10^5	1.8	Pevná látka
PLCL 50/50	50:50	2.6×10^5	1.8	Elastomer
PLCL 30/70	30:70	1.5×10^5	2.2	Gumovitá látka
PCL	0:100	1.8×10^5	2.1	Pevná látka

Obr 7 Různé poměry PLC kopolymeru a jejich vlastnosti.

Převzato z: (Kwon 2005)

2.5.3 Degradace PLC

PLC spadá do skupiny alifatických polyesterů, tudíž jeho rozklad probíhá vlivem již dříve popsané enzymatické degradace, která katalyzuje hydrolýzu. Enzymy totiž snižují Gibbsovu volnou aktivační energii a každé snížení aktivační energie snižuje kinetickou bariéru rychlosti reakce, a tím urychluje proces katalytické reakce. (Schnabel 1981), (Voet 1995)

Vzhledem k tomu, že enzymy jsou velké molekuly, které se nemohou šířit do krystalických oblastí, tak podporují povrchovou erozi. Během první fáze eroze tedy dochází k pronikání vodného roztoku do polymeru, následované hydrolytickým

štěpením esterových vazeb v PLC, tedy převedení dlouhého polymerního řetězce na kratší ve vodě dále snadněji štěpitelné oligomerní fragmenty. (Viera 2011)

Stejně jako u ostatních odbouratelných polyesterů je rychlost degradace ovlivněna molekulární strukturou, molekulovou hmotností, hustotou esterových vazeb, teplotou a typem degradačního média. Velmi důležitým faktorem je také stupeň krystalinity, neboť krystalické oblasti jsou méně prostupné pro pronikání vody, což hydrolyzu zpomaluje. You (2005) ve své studii potvrzuje, že hydrolytická degradace nastává přednostně v amorfni fázi, teprve poté následována degradací ve fázi krystalické. Podstatný vliv může mít teplota a pH vodního média, ovšem v případě medicínských aplikací je lze považovat za konstantní, neboť teplota i pH se v lidském těle udržuje na homeostatické hodnotě. (Viera 2011)

Během hydrolytické degradace samozřejmě dochází ke snížení molekulové hmotnosti a úbytku hmotnosti polymeru vlivem štěpení vazeb a rozpadu řetězce na kratší fragmenty. You (2005) informuje o úbytcích váhy PLA, PLGA, PGA nanovlákných vrstev, kdy PGA vzorek dosáhl 40% své původní hmotnosti po 20 dnech degradace, PLGA se na 50% své původní hmotnosti dostal kolem 45 dne degradace a PLA i po 45 dnech nevykazoval výrazné úbytky na váze. Viera (2011) ve své práci uvádí, že PLC vlákna ztratila okolo 20% ze své původní hmotnosti po 28 týdnech.

2.5.4 Aplikace PLC

Na základě vynikající biokompatibility a biodegradability je o alifatické polyestery a jejich kopolymery obrovský zájem, zejména v lékařských aplikacích, především pro systémy řízeného podávání léčiv, transplantace kůže, scaffoldy pro tkáňové inženýrství. PLC je v současné době předmětem studií mnoha vědeckých týmů, které se na základně svých výzkumů snaží zdokonalovat metody aplikací stávajících a nacházet nové potenciální aplikace.

PLC má jednu zásadní výhodu a to je široká variabilita vlastností, lze jej připravit jako materiál s velmi dobrými mechanickými vlastnostmi nebo naopak jako vysoce elastický materiál, případně lze vhodnou syntézou připravit materiál vykazující vysokou mechanickou pevnost a zároveň vysokou elasticitu. PLC takovýchto vlastností

byl použit pro několik studií zabývajících se regenerací kostí, chrupavek, náhradou poškozené kůže, cévním bioinženýrstvím, regenerací nervové tkáně a cíleným dodáváním léčiv s řízeným uvolňováním. (Braghirolli 2014)

Akkauch (2011) se ve své studii zaměřuje na vývoj biomimetického porézního kompozitního 3D scaffoldu pro regeneraci kostí. Jako kompozitní strukturu se svým týmem navrhl PLC/kolagen/hydroxyapatit, ta vykazuje vysokou osteokonduktivitu, podporu a adhezi osteoblastů, tvorbu a růst kostní tkáně a je chemicky velmi podobná lidským kostem. Vývojem dalšího kompozitu se ve své práci věnuje Vergroesen (2011), ten navrhuje spojení PLC scaffoldu s kmenovými buňkami (ASC)/ růstovými faktory, který následně zkoumá v modelu páteře kozy. Výsledky dokládají, že takto připravený scaffold vykazuje vysokou biokompatibilitu, usnadňuje vaskulogenezi a podporuje rychlé upevnění ASC a navíc je díky PLC radiolucenční. Kim (2012) podává informace o použití kompozitního systému PLC/heparin na bázi hydrogelu pro regeneraci defektů chrupavek. Spojení porézního PLC scaffoldu a hydrogelu (heparin a chondocyty) vykazuje zvýšenou expresi chondogenních genů oproti systémům bez hydrogelu a výbornou tvorbu chrupavky, což dokazuje dobrou interakci s okolím.

Taktéž z oblasti cévního inženýrství předkládají vědci své výsledky. Wang (2013) se ve své studii malo-průměrových cév z kompozitního materiálu zaměřuje na zlepšení průchodnosti cévního implantovaného štěpu. Cévy z PLC se začleněným heparinem, jež je schopný řízeného uvolňování, byly vytvořeny koaxiálním zvlákňováním v modelu jádro-plášť (heparin-PLC). Jak dokazují výsledky, podobnost biomechanických vlastností PLC cév (multiporézní struktura, biokompatibilita) a začleněný heparin uvolňující se po dobu 12 týdnů, výrazně podporují průchodnost cév. Kromě mechanické odolnosti a dostatečné elasticity je předpokladem kvalitního a zcela funkčního cévního štěpu pórovitost cévních stěn. Na tuto problematiku se ve své práci zaměřuje Tara (2014). Jeho studie přináší poznatky o kompozitních cévních systémech z PLA-PLC obsahující velké póry. Tyto kompozitní štěpy dle výsledků vyvolávají po 12 měsících implantace pouze malé zjizvení cévních stěn, naopak dochází k tvorbě velkého množství buněk hladkého cévního svalstva, a tím zabraňují kalcifikaci štěpu.

Kopolymer PLC může nalézt uplatnění pro kožní transplantace po popáleninách, zjizvení pokožky či jiných poraněních kůže. Dvouvrstvý scaffold, koncipovaný pro aplikaci umělé kožní tkáně, zhotovený z dvou různých biomateriálů – kombinace PLC/Poloxamerní nanovláknů a Dextran/Želatinový hydrogel ve své práci navrhuje a testuje Pan (2014). Dle dosažených výsledků scaffold poskytuje optimální mechanickou pevnost, biokompatibilitu, vykazuje velice podobnou strukturu nativní kůže. Hydrogel navíc podporuje rychlý růst buněk a vytváří vhodné prostředí pro jejich další množení. Lorden (2015) ve své studii interpretuje velice pozitivní výsledky o využití elastomerního PLC scaffoldu, který výrazným způsobem zmírňuje hypertrofické kontrakce jizev vzniklých poškozením pokožky, nedochází tak k tvorbě výrazných zarudlých a nevzhledných stigmat.

V rámci měkkého tkáňového inženýrství jsou samozřejmě prováděny další studie. Garkhal (2007) zkoumá modifikované PLC mikrosféry tvořící podpůrný skelet. Testování prokazuje účinnost modifikace. Mikrosféry, jejichž povrch je upraven pomocí peptidu P-15, vykazují velmi dobrou adhezi, proliferaci i životaschopnost buněk oproti mikrosférám bez modifikace. Kopolymer PLC je též testován pro potenciální využití pro regeneraci močového měchýře. Pokrywczynska a kol. (2014) navrhuje pro regeneraci pětivrstvou PLC membránu, kterou porovnávají se stěnou tenkého střeva, která se pro regeneraci močového měchýře běžně využívá. Výsledky jsou ovšem poněkud neuspokojivé. Během testování docházelo k řadě nežádoucích účinků, např. k perforacím stěny měchýře, tvorbě výchlípek a píštělů a začleňování rekonstruované stěny do dutiny močového měchýře. Za těchto podmínek má PLC pro tuto aplikaci velmi malý potenciál. Nicméně Pokrywczynska a kol. se domnívají, že komplikace může způsobovat vícevrstvá konstrukce a orientovaná struktura membrány, proto svou studii nadále rozvíjejí a snaží se vznikajícím komplikacím zamezit.

V současné době se PLC stává stěžejní pro aplikaci v DDS. PLC zde představuje podpůrný nosič, tedy biodegradabilní skelet napomáhající obnově nově vznikajících tkání a díky začleněným aktivním látkám se stává bioaktivním. Látky v něm zapouzdřené, jejichž cílené uvolňování je možno dle potřeby řídit, mohou mít různou funkci. Mohou napomáhat rychlejšímu hojení, proliferaci buněk nebo naopak

zamezit růstu poškozených či zmutovaných buněk nebo mohou zamezit nežádoucím komplikacím po implantaci scaffoldu do těla pacienta (infekce, záněty). Jiang (2014) ve své studii přináší výsledky o možnostech začleňování růstových faktorů, DNA, bakterií, virů a dalších bioaktivních látek do PLC nosičů pomocí koaxiálního zvlákňování a interpretuje výsledky testování řízeného uvolňování těchto inkorporovaných látek. Kijenská (2014) interpretuje výsledky své studie zaměřené na interakci Schwannových buněk s lamininem zapouzdřeném v PLC nanovlákněném scaffoldu pro případné využití v nervovém tkáňovém inženýrství. Bioaktivní skelet byl opět vytvořen koaxiálním zvlákňováním ve formě jádro-plášť. Testy potvrdily výrazně vyšší proliferaci buněk u scaffoldů s lamininem inkorporovaným uvnitř nanovláken oproti scaffoldům vytvořených zvlákňováním směsi PLC/laminin. Metoda koaxiálního zvlákňování se tedy zdá být poměrně slibnou metodou k přípravě nanovlákných nosičů s vylepšenou funkcí. Gupta (2014) v rámci své studie navrhuje hybridní PLC scaffold se začleněným 5-Fluorouracilem, jakožto potenciální chemoterapeutický implantát. Dle výsledků je nejvhodnějším kandidátem pro budoucí použití elektrostaticky připravený scaffold z kopolymeru PLC v poměru monomerů 80:20, ten vykazuje nejvhodnější kinetiku uvolňování aktivní látky a vykazuje značnou apoptózu nádorových buněk.

Výše uvedené aplikace jsou pouze skromným výčtem a prozatím jsou pouze potenciální, ale vzhledem k velice pozitivním a uspokojivým výsledkům je jen otázkou času, než se začnou běžně využívat v praxi. V současné době samozřejmě probíhají další studie a nezbyvá než čekat na výsledky, které přinesou, a kam se posune hranice využitelnosti a poznatků ohledně kopolymeru PLC.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem práce bylo nejprve stanovit spolu s dalšími parametry především vliv molekulové hmotnosti a poměru monomerů L-lactide a ϵ -caprolactone, na výsledný produkt elektrostatického zvlákňování/sprejování. PLC kapsle s nejvhodnějšími parametry následně použít jako nosnou strukturu pro PVA částice, které budou inkorporovány pomocí metody kombinující elektrospraying a elektrospraying. V posledním experimentu provést studium kinetiky uvolňování na základě stanovení absorbancí degradačních roztoků odebíraných v průběhu enzymatické degradace.

Materiály

PLC (70:30) – inherentní viskozita 1,2 – 1,8 dl·g⁻¹; M_m : 95 000 g·mol⁻¹; (Corbion)

PLC (50:50) – M_m : 45 – 55 000 g·mol⁻¹; (Polysciotech)

PLC (30:70) – M_m : 45 – 55 000 g·mol⁻¹; (Polysciotech)

PVA – M_m : 47 000 g·mol⁻¹; (Kuraray)

PVB – M_m : 60 000 g·mol⁻¹; (Kuraray)

FITC - (Biotium)

Rhodamin B – Isomer I; (Sigma Aldrich)

Chloroform (PENTA)

Ethanol (PENTA)

Kyselina Octová (PENTA)

3.1 Příprava roztoků PLC

K přípravě roztoků by použity tři následující polymery: PLC (PURASORB 7015) dodávaný společností Corbion (Holandsko) s poměrem monomerů L-lactide a ϵ -caprolactone 70:30 a výrobcem udávanou inherentní viskozitou 1,2 – 1,8 dl·g⁻¹. Molekulová hmotnost byla stanovena gelovou chromatografií na 95 000 g·mol⁻¹. (Vejsadová 2015). Polymer v základní formě byl v podobě jemného granulátu s lehkým mléčným zabarvením. Dalším polymerem byl PLC (AP67) s poměrem monomerů 50:50 a výrobcem udávanou molekulovou hmotností 45-55 000 g·mol⁻¹. Posledním byl PLC (AP74) o poměru monomerů 30:70 a molekulové hmotnosti 45-55 000 g·mol⁻¹.

Oba tyto polymery byly dodány společností Polyscitech (USA). V případě PLC 50:50 se v základní formě jednalo o elastomerní granulát nepravidelných tvarů s charakteristickou lehce zpěněnou strukturou. PLC 30:70 byl v základní formě v podobě měkkého gumovitého granulátu iregulárních tvarů.

Dále bylo k přípravě roztoků zapotřebí vhodných rozpouštědlových systémů. Pro tyto účely byl použit čistý trichlormethan, též známý jako chloroform se sumárním vzorcem CHCl_3 . Jedná se o bezbarvou velice těkavou, avšak nehořlavou kapalinu s charakteristickou nasládlou vůní. Vzniká zahříváním směsi chloru a chlormethanu či methanu na teplotu 400-500 °C, vzniklá směs čtyř chlorovaných uhlovodíků, které se následně oddělí destilací na čisté produkty (jedním z nich je právě chloroform). Jako druhý by použit rozpouštědlový systém 8:1:1, směs čistého chloroformu, ethanolu a kyseliny octové (dále jako CHEKO). Pro tento systém bylo použito denaturovaného ethylalkoholu ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), bezbarvé hořlavé kapaliny s typickou alkoholovým zápachem s přidanými denaturačními činidly (4-5 %). Dále kyseliny octové (ethanové), druhé nejjednodušší karboxylové kyseliny s funkčním vzorcem CH_3COOH . Za normálních podmínek se jedná o bezbarvou kapalinu velmi pronikavého charakteristického zápachu.

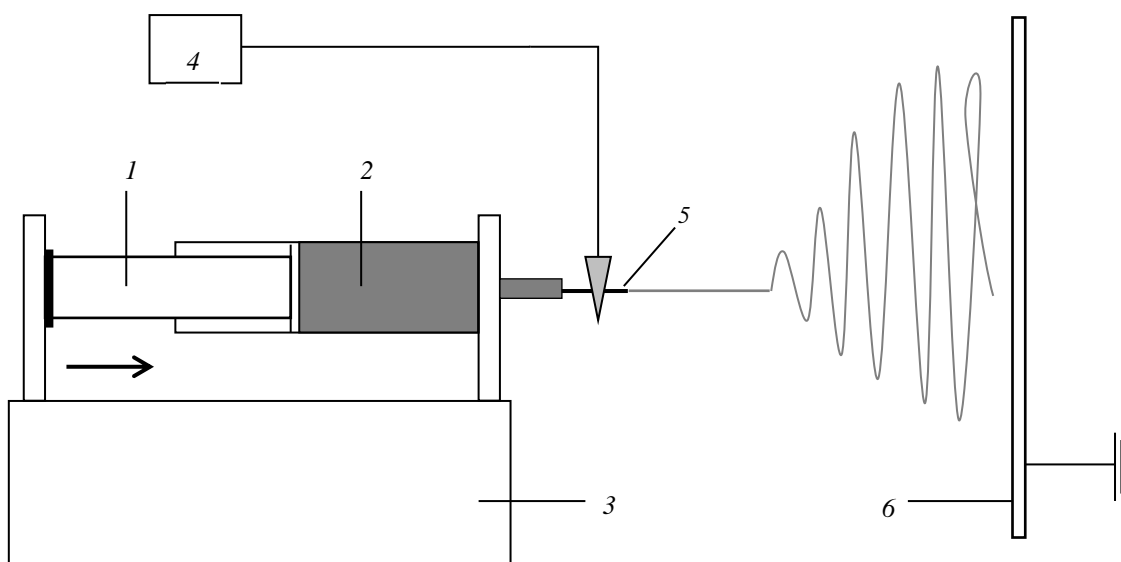
Pro první experiment byly z výše uvedených materiálů připraveny koncentrační řady roztoků o koncentracích 2, 5, 7,5 a 10 hm %. Jako rozpouštědlo byl použit 100% chloroform. Na základě obrazové a vizuální analýzy byl pro nadcházející experimenty vybrán PLC Purasorb 7015 (70:30). Tento krok bude objasněn v kapitole 3.1.1.1.

Pro studium vlivu koncentrace na výsledné produkty byly vytvořeny dvě jemnější řady roztoků, již pro oba rozpouštědlové systémy (chloroform i CHEKO). Byly stanoveny koncentrační řady o 1, 2, 3, 4, 5 a 6 hm %.

Pro experiment se změnami vlhkosti během procesu zvlákňování byly připraveny roztoky o 2 a 4 hm %. Tyto koncentrace byly zvoleny na základě vyhodnocení pokusu vlivu koncentrace polymerních roztoků na zhotovený produkt.

3.1.1 Elektrostatické zvlákňování PLC roztoků z jehly

Elektrostatické zvlákňování probíhalo za pomoci vysokého napětí, které prochází mezi elektrodou a kolektorem (blíže byla tato problematika popsána v kapitole 2.2). Zvlákňování PLC roztoků probíhalo na zařízení pro elektrostatické zvlákňování z jehly, přesněji řečeno z injekční stříkačky, jak popisuje schéma na obr. 8.



Obr. 8 Schéma laboratorního zařízení pro elektrostatické zvlákňování z injekční stříkačky. 1 – injekční stříkačka, 2 – polymerní roztok, 3 – dávkovací zařízení, 4 – zdroj vysokého napětí, 5 – jehla, 6 – kolektor

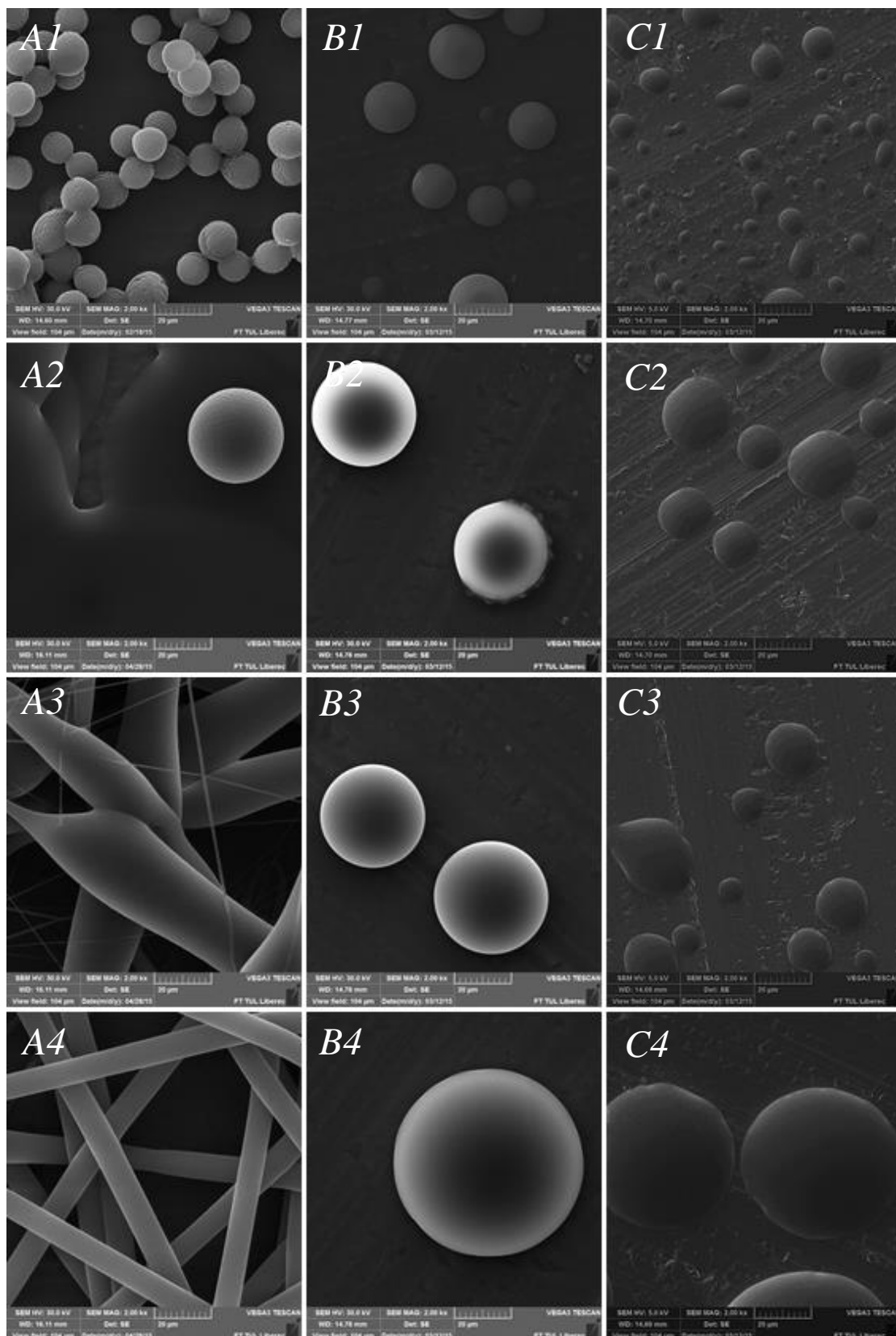
Každý polymerní roztok byl umístěn do injekční stříkačky a upevněn do dávkovacího zařízení (lineární pumpy). Pro prvotní experiment (studium vlivu molekulové hmotnosti a poměru monomerů v kopolymeru), který byl proveden za účelem výběru nejvhodnějšího PLC pro nadcházející experimenty, byly podmínky následující: dávkování polymeru bylo nastaveno na 8ml/hod, vzdálenost jehly od kolektoru byla 250 mm a zvlákňování probíhalo při napětí 18 kV. Vznikající produkt (částice) byl sbírán kolektorem, který byl opatřen hliníkovou fólií pro lepší analýzu na elektronovém mikroskopu. Klimatické podmínky během procesu zvlákňování byly 24 °C a 40% relativní vlhkosti (RH).

Pro další experimenty byly podmínky mírně upraveny. Dávkování polymeru bylo sníženo na 5ml/hod, vzdálenost jehly od kolektoru byla navýšena na 300 mm za účelem dostatečného odpaření rozpouštědla a napětí při zvlákňování bylo nastaveno

na 15 kV. Zvlákňování probíhalo při 22 °C a postupně při třech různých RH (25%, 40%, 60%). Změna RH byla provedena za účelem optimalizace výsledného produktu.

3.1.1.1 Vliv molekulové hmotnosti a poměru monomerů PLC na výsledný produkt

V této kapitole bude objasněn vliv molekulové hmotnosti a poměru jednotlivých monomerů na výsledný produkt. Jak již bylo řečeno, k dispozici byly tři typy kopolymerů s rozdílnými molekulovými hmotnostmi a především poměrem monomerů L-lactide a ϵ -caprolactone. Experiment byl vyhodnocen na základě rastrovací elektronové mikroskopie (dále SEM). Za pomoci elektronového mikroskopu VEGA 3 TESCAN byly pořízeny snímky jednotlivých koncentrací (2, 5, 7,5, 10 hm %) pro všechny typy kopolymerů. Tyto snímky byly následně hodnoceny vizuálně, a také byla provedena obrazová analýza za pomoci softwaru Nis-elements. Tímto nástrojem byly proměřeny průměry nasprejovaných částic či vyzvlákněných vláken.



Obr. 9 Snímky z elektronového mikroskopu. Vliv molekulové hmotnosti a poměru monomerů na tvar a velikost výsledného produktu (rozpuštědlo chloroform, RH 40%). (A) PCL 70:30, (B) PLC 50:50, (C) 30:70, 2 hm% (1), 5 hm% (2), 7,5 hm% (3), 10 hm% (4). Zvětšení (2000x).

Vizuální hodnocení

Obr. 9 (A) zastupují koncentrační řadu kopolymeru PLC (70:30) s molekulovou hmotností $95\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, tedy nejvyšší ze všech použitých kopolymerů. Obr 9 (A1) představuje dvouprocentní hmotnostní koncentraci PLC. Jak je vidět ze snímku, částice se vyznačovaly pravidelným sférickým tvarem a povrchovými, nikterak hlubokými propadlinami. Částice dosahovaly velikosti desítek μm . Jejich průměr byl $11,47 \pm 2,94\ \mu\text{m}$. Obr. 9 (A2) představuje pětiprocentní hmotnostní koncentraci PLC. Ze snímku je vidno, že docházelo k výraznému slévání částic a tvorbě polymerního filmu na povrch Al fólie. Pravděpodobně způsobeno počátečním nevhodným nastavením zvlákňovací aparatury. Vznikající částice vykazovaly pravidelné kulovité tvary, avšak vyskytovaly se pouze sporadicky, a proto nebylo možné u této koncentrace provést statistické vyhodnocení. Dalším krokem experimentu bylo zvlákňování sedmi a půl procentní hmotnostního roztoku PLC 70:30, jak naznačuje obr. 9 (A3). V případě této koncentrace již nedocházelo k tvorbě částic, ale byla vytvářena vláknenná struktura sestávající z velice nepravidelných vláken obsahujících značné defekty, z toho důvodu nebyla provedena statistická analýza. Obr. 9 (A4) zachycuje desetiprocentní hmotnostní koncentraci. Tato koncentrace již umožňuje tvorbu vcelku pravidelných vláken dosahujících průměru $8,44 \pm 2,37\ \mu\text{m}$.

Snímky na obr. 9 (B) představují koncentrační řadu kopolymeru PLC (50:50) s molekulovou hmotností $45 - 55\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Obr. 9 (B1) zachycuje dvouprocentní hmotnostní koncentraci PLC. Částice se vyznačovaly pravidelným sférickým tvarem podobně jako 2 hm % koncentrace PLC 70:30 byl jejich povrch tvořen vnějšími povrchovými defekty. V nasprejované vrstvě se však objevoval i podíl částic, které vytvářely nepravidelné tvary, slévaly se a působily mírně rozteklým dojmem. Jejich průměr dosahoval $13,18 \pm 2,14\ \mu\text{m}$, tedy téměř o dva μm více než PLC (70:30) o stejné koncentraci. Obr. 9 (B2) představuje pětiprocentní hmotnostní koncentraci PLC. Tyto částice se svým charakterem prakticky nelišily od částic předcházející koncentrace, nicméně došlo k velice výraznému nárůstu velikosti částic. Jejich průměr nabýval $28,45 \pm 7,86\ \mu\text{m}$. Obr. 9 (B3) vyobrazuje částice připravené z roztoku o koncentraci 7,5 hm % a obr. 9 (B4) částice z roztoku o koncentraci 10 hm %. Z obou koncentrací byly zhotoveny částice s pravidelným sférickým tvarem, ale převažovaly

částice s tvarem iregulárním. Ten byl způsoben sléváním a roztékáním dopadajících částic, buď v důsledku nedostatečné vzdálenosti kapiláry od kolektoru nebo vlivem nižší molekulové hmotnosti kopolymeru PLC (50:50) oproti PLC (70:30). Průměry částic u 7,5 hm % koncentrace dosahovaly $45,42 \pm 18,87 \mu\text{m}$. U částic o 10 hm % koncentraci průměry nebylo možné proměřit, důvodem byl velice malý počet částic zachycených na snímcích i při nejnižším možném zvětšení (100x).

Koncentrační řada kopolymeru PLC (30:70) o molekulové hmotnosti 45 – 55 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ je zachycena na obr. 9 (C). Obr. 9 (C1) představuje dvouprocentní hmotnostní koncentraci. Částice připravené z tohoto roztoku se vyznačovaly spíše nepravidelným tvarem a vykazovaly širokou distribuci velikosti. Průměrná hodnota průměru byla stanovena na $4,12 \pm 2,78 \mu\text{m}$, přičemž proměřování bylo znesnadněno vysokým výskytem rozteklých částic. I částice vykazující poměrně kulovitý tvar však připomínají dopadající kapičky vody. Další obr. 9 představují pětiprocentní (C2), sedmi a půl procentní (C3) a deseti procentní (C4) hmotnostní koncentraci. Částice projevují stejný charakter jako předešlá koncentrace, tedy nepříliš pravidelné, neostré, slité tvary částic. Ale docházelo k nejrapidnějšímu nárůstu velikosti částic. Průměr u částic z 5 a 7 hm % nebylo možné stanovit v důsledku nedostatečného počtu částic. U částic z 10 hm % roztoku byl průměr stanoven z malého počtu měření, tedy spíše orientačně. Průměr vláken dosahoval $43,59 \pm 16,17 \mu\text{m}$.

Statistické hodnocení

Během statistické analýzy bylo snahou provést sto a více měření pro každou koncentraci jednotlivých kopolymerů. Ovšem ne u všech koncentrací to bylo možné. Příčinou byl malý počet vytvořených částic zachycených na snímcích, což může být způsobeno zvlákněním malého množství polymeru, případně ne zcela vhodně připraveného vzorku pro SEM analýzu. U některých koncentrací tedy bylo realizováno nanejvýš padesát měření a u PLC 50:50 o koncentraci 10 hm % nebylo možné provést měření vůbec. Obrazovou analýzou byly stanoveny základní statistické údaje, jako jsou průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota charakterizující velikosti částic. Údaje jsou zaneseny v tabulkách 1, 2, 3.

Tab. 1 Statistické údaje velikosti průměru PLC (70:30) částic a vláken.

Koncentrace [hm %]	2	5	7,5	10
	Částice		vlákna	
Počet měření [-]	150	-	-	33
Aritmetický průměr [μm]	11,45	-	-	8,44
Směrodatná odchylka [μm]	2,78	-	-	2,37
Minimum [μm]	1,33	-	-	1,94
Maximum [μm]	19,64	-	-	10,24

Tab. 2 Statistické údaje velikosti průměru PLC (50:50) částic.

Koncentrace [hm %]	2	5	7,5	10
Počet měření [-]	150	125	70	-
Aritmetický průměr [μm]	13,18	28,42	45,42	-
Směrodatná odchylka [μm]	2,14	7,86	18,87	-
Minimum [μm]	7,86	8,16	9,40	-
Maximum [μm]	19,06	53,35	88,50	-

Tab. 3 Statistické údaje velikosti PLC (30:70) částic.

Koncentrace [hm %]	2	5	7,5	10
Počet měření [-]	150	47	50	50
Aritmetický průměr [μm]	4,12	15,16	11,33	16,17
Směrodatná odchylka [μm]	2,78	8,55	6,44	16,17
Minimum [μm]	1,33	2,98	2,99	18,40
Maximum [μm]	19,64	43,52	32,2	72,39

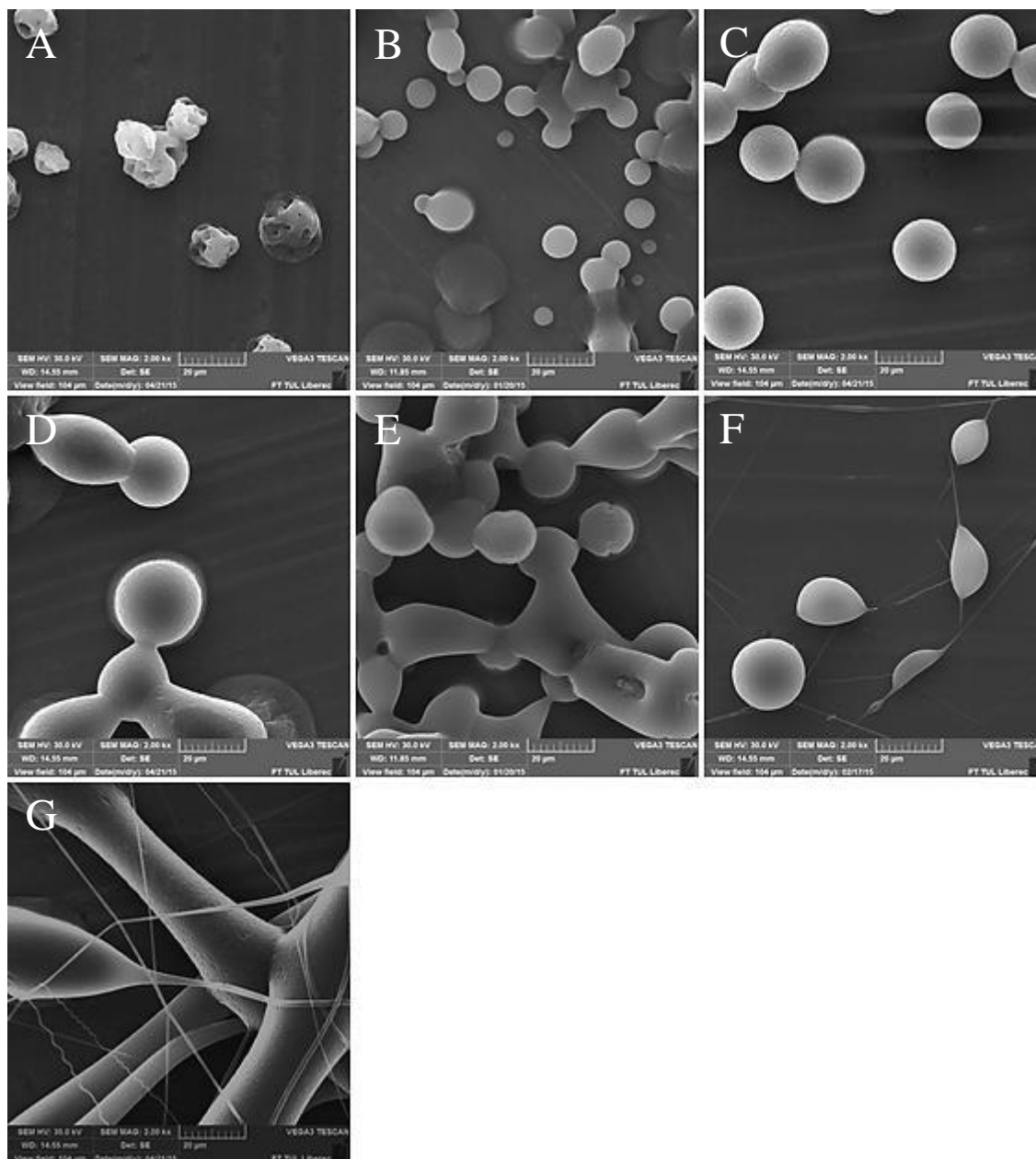
Jak bylo popsáno výše, a jak je pouhým okem patrné, každý kopolymer PLC se chová zcela jinak a částice z něj připravené mají při naprosto stejných podmínkách zcela odlišné vlastnosti a dosahují jiných velikostí. Jedním z důvodů může být rozdílná molekulová hmotnost jednotlivých kopolymerů. Je patrné, že PLC (50:50) a PLC (30:70) o shodné molekulové hmotnosti ($45 - 55\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) vykazují sklon k částečnému až výraznému slévání a roztékání vznikajících částic. To může být samozřejmě způsobeno i nedostatečnou vzdáleností kapiláry od kolektoru, ovšem částice z PLC (70:30) o molekulové hmotnosti $97\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ toto chování nevykazovaly v takové míře jako zbývající dva kopolymery. Lze tedy usuzovat, že vyšší molekulová hmotnost může přispívat k tvorbě částic pravidelnějších kulovitých tvarů, s minimálním výskytem slévání částic.

Daleko větší vliv však nejspíše má poměr monomerů. Jak již bylo řečeno v kapitole 5.2.2, poměr monomerů L-lactide a ϵ -caprolactone se značně odráží v chování samotného polymeru, potažmo ve vlastnostech vznikajícího produktu. Dle Kwona (2005) má poměr monomerů v kopolymeru PLC výrazný vliv na fyzický stav polymeru. Na základě jeho práce se v případě PLC (70:30) jedná o pevnou látku, v případě PLC (50:50) se jedná o látku elastomerní a PLC (30:70) je charakterizován jako látka gumovitá. Na základě vizuálního hodnocení základních granulátů kopolymerů, které byly k dispozici, lze s tímto tvrzením souhlasit. Z dosažených výsledků lze tedy vyvozovat, že kopolymer se snižujícím se podílem monomeru L-lactide bude nejspíše vykazovat částice s nepravidelným tvarem a tendencí ke slévání sprejovaných částic.

Z důvodů, které byly v této kapitole uvedeny, byl pro realizaci všech následujících experimentů zvolen PLC (70:30), který vykazoval nejoptimálnější vlastnosti vznikajících částic.

3.1.1.2 Vliv koncentrace roztoku PLC (chloroform) na výsledný produkt

V této kapitole bude objasněn vliv koncentrace roztoků PLC za použití chloroformu jako rozpouštědla. Pro jednotlivé koncentrace polymerní řady (1,2,3,4,5,6,8 hm %) byly opět pořízeny snímky pomocí elektronového mikroskopu. Tyto snímky byly následně vizuálně hodnoceny a poté vyhodnoceny prostřednictvím obrazové analýzy.



Obr. 10 Snímky z elektronového mikroskopu. Závislost koncentrace na tvaru a velikost výsledného produktu při elektrostatickém zvláknění (rozpuštědlo chloroform, RH 25%). 1 hm% (A), 2 hm % (B), 3 hm % (C), 4 hm % (D), 5 hm % (E), 6 hm % (F) a 8 hm % (G) Zvětšení (2000x)

Vizuální hodnocení

Obr. 10 (A) představuje částice připravené z jednéprocentní hmotnostní koncentrace, přičemž částice vykazují nepravidelné tvary s výraznými propadlinami povrchu směrem do středu částice. Toto borcení struktury je nejspíše způsobeno příliš rychlým odpařováním rozpouštědla, vlivem velice malé koncentrace polymerního roztoku.

Z důvodu iregulárních tvarů vznikajícího produktu nebylo provedeno statistické vyhodnocování. Obr. 10 (B) zachycuje částice z dvouprocentní hmotnostní koncentrace. Zde se již propadliny na povrchu částic neobjevují a částice vykazují pravidelné kulovité tvary, jejichž průměr byl vyhodnocen na $8,25 \pm 2,98 \mu\text{m}$. Slévání sfér bylo pravděpodobně způsobeno nedokonalým počátečním nastavením aparatury elektrostatického zvlákňování. Obr. 10 (C) ukazuje tříprocentní hmotnostní koncentraci. Částice zvlákněné z tohoto roztoku vykazovaly ukázkový sférický tvar s nepatrnými defekty povrchu v podobě propadlinek směřujících do středu částic. Průměr těchto částic dosahoval $17,17 \pm 4,59 \mu\text{m}$. Experiment pokračoval přípravou čtyřprocentní hmotnostní koncentrace, obr. 10 (D). Útvary vznikající při zvlákňování tohoto roztoku částečně vykazovaly pravidelné kruhové tvary, ale docházelo i k nedostatečnému oddělování jednotlivých sfér, tedy ke slévání a tvorbě aglomerátů. Proto nebylo možné provést statistickou analýzu. Na obr. 10 (E) je zastoupena pěti procentní hmotnostní koncentrace, kdy mimo tvorby částic, jejichž kruhový tvar byl mírně deformován, navíc docházelo k tvorbě slévajících se shluků v důsledku nedostatečného formování jednotlivých částic. Tento jev mohlo způsobit vyšší dávkování na počátku zvlákňování, nastavené pro urychlení procesu. Nicméně bylo možné provést proměření průměrů a průměrná hodnota byla stanovena na $15,31 \pm 4,49 \mu\text{m}$. Na snímku 10 (F) je zachycena šestiprocentní hmotnostní koncentrace. Tato koncentrace je v koncentrační řadě roztoků PLC (70:30) bodem, kdy vznikající částice jsou deformovány vlivem vláken z nich se vytahujících. Vlákna ovšem nevzniká mnoho, objevují se spíše sporadicky. V důsledku malého výskytu částic i vláken na pořízených snímcích nebylo možné provést obrazovou analýzu a statistické vyhodnocení. Závěrem experimentu bylo zvláknění roztoku o osmiprocentní hmotnostní koncentraci, ukázáno na obr. 10 (G). Snímek dokládá tvorbu vláken, ovšem značně nestejných s a s velkým množstvím defektů. S ohledem na tuto skutečnost i na množství vznikajících vláken nebylo provedeno proměřování průměrů a statistické hodnocení. Z tohoto obr. i obr. 9 (A4) z předchozí kapitoly lze vyvodit, že čistý chloroform není pro tvorbu pravidelných stejnoměrných vláken z PLC (70:30) vhodným rozpouštědlem.

Statistické hodnocení

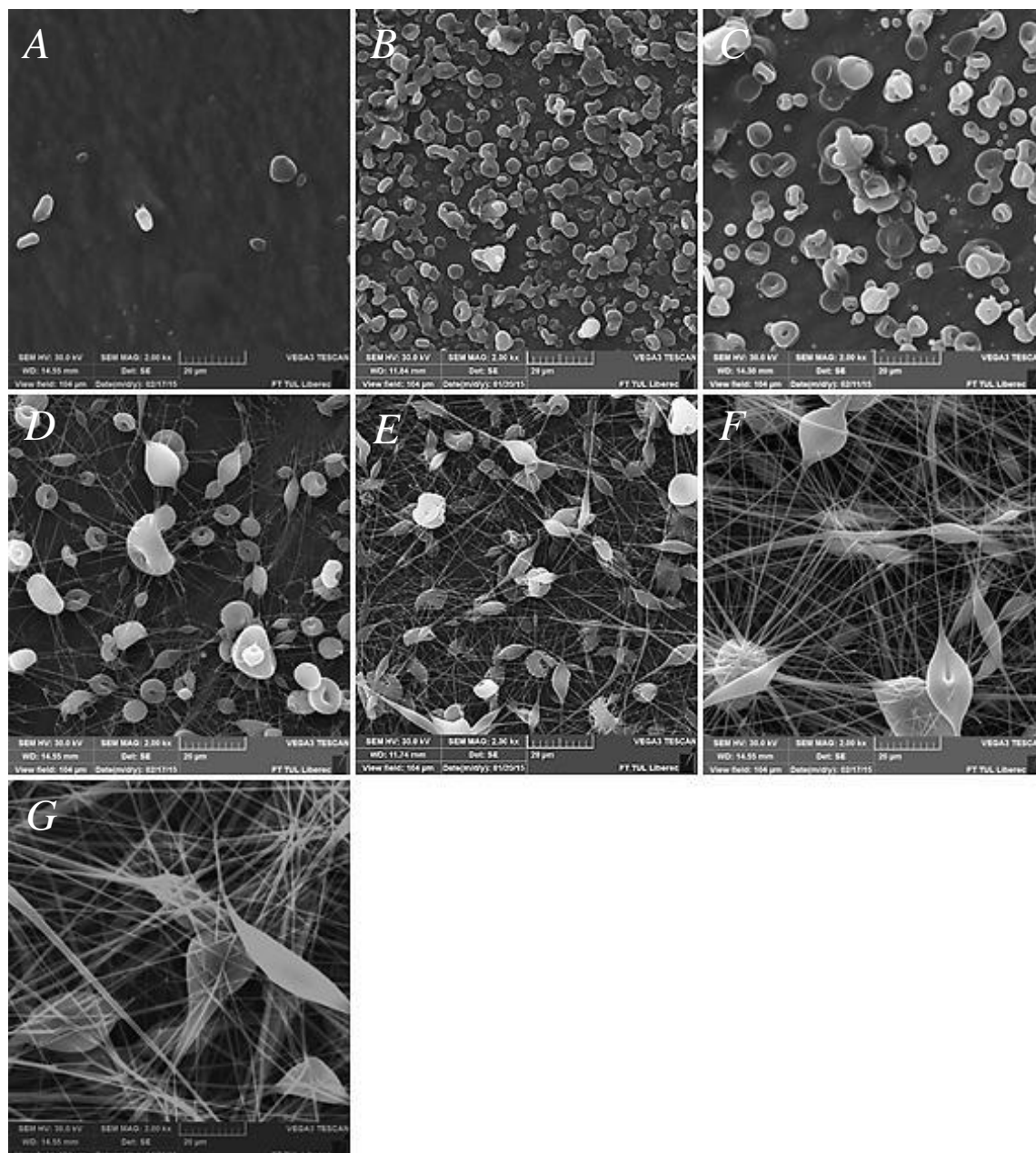
Obdobně jako u předchozího experimentu i zde bylo po vizuálním hodnocení provedeno statistické vyhodnocení na základě obrazové analýzy. Bylo snahou provádět sto padesát měření pro každou koncentraci, avšak to nebylo možné vždy (viz důvody uvedené výše). Opět byly vyhodnoceny základní statistické údaje, průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota velikosti vznikajících částic. Údaje jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4 Statistické údaje velikosti průměru PLC (70:30) částic v závislosti na vzrůstající koncentraci

Koncentrace [hm %]	1	2	3	4	5	6	8
Počet měření [-]	-	150	40	-	150	-	-
Aritmetický průměr [μm]	-	8,25	17,17	-	15,39	-	-
Směrodatná odchylka [μm]	-	2,98	4,59	-	4,49	-	-
Minimum [μm]	-	2,58	2,86	-	2,39	-	-
Maximum [μm]	-	17,61	23,46	-	23,52	-	-

3.1.1.3 Vliv koncentrace roztoku PLC (CHEKO) na výsledný produkt

Tato část experimentu se zabývá vyhodnocením vlivu koncentrace PLC, kdy byl použit rozpouštědlový systém CHEKO (8:1:1). Podmínky pro zvlákňování byly stejné jako u polymerní řady s chloroformem. Snímky byly získány též stejným způsobem jako u předchozího experimentu. Dále bylo provedeno vizuální a statistické vyhodnocení.



Obr. 11 Snímky z elektronového mikroskopu. Závislost koncentrace na tvaru a velikost výsledného produktu při elektrostatickém zvlákňování (rozpouštědlo CHEKO, RH 25%). 1 hm % (A), 2 hm % (B), 3 hm % (C), 4 hm % (D), 5 hm % (E), 6 hm % (F) a 8 hm % (G) Zvětšení (2000x)

Vizuální hodnocení

Experiment započal zvlákňením jednaprocentní hmotnostní koncentrace obr. 11 (A). Ze snímku je patrné, že výskyt částic byl minimální, a pokud se objevily, nabývaly nepravidelných tvarů. Většina polymerního roztoku však vytvořila na povrchu hliníkové fólie souvislý film, pravděpodobně zapříčiněno nízkou viskozitou roztoku. Obr. 11 (B)

zastupuje dvouprocentní hmotnostní koncentraci. Snímek dokládá hojný výskyt částic nepravidelných tvarů s charakteristickou strukturou, tedy „důlkem“ či dvěma uprostřed částice, který způsobuje kyselina octová obsažená v rozpouštědlovém systému. Částečně docházelo ke shlukování částic, což bylo nejspíše podpořeno koncentrací roztoku. Průměry částic dosahovaly $3,27 \pm 1,36 \mu\text{m}$. Obr. 11 (C) ukazuje tříprocentní hmotnostní koncentraci. Částice vykazují obdobný charakter jako koncentrace předchozí, s tím že došlo k výraznějšímu nárůstu průměru částic, který dosahoval $5,52 \pm 2,39 \mu\text{m}$. Na obr. 11 (D) je vyobrazena čtyřprocentní hmotnostní koncentrace, kdy podobně jako tomu bylo u šestiprocentního roztoku PLC za použití chloroformu, je tato koncentrace bodem, kdy se vytvářejí nejen částice, ale též vlákna, ovšem poněkud nepravidelná. Ta se vytahují z částic, čímž je deformují. Tuto koncentraci tedy lze označit za hranici mezi tvorbou částic a vláken. Částice si vedle mírných defektů zachovávají svoji typickou strukturu a jejich průměry opět mírně vzrostly a dosahovaly $6,37 \pm 2,64 \mu\text{m}$. Naproti tomu průměr vláken dosahoval $410 \pm 90 \text{ nm}$. Pokus pokračoval přípravou pětiprocentní hmotnostní koncentrace, obr. 11 (E). Zvlákněním roztoku o této koncentraci docházelo opět k tvorbě kombinovaného produktu – částic i vláken. Přestože byly částice více deformovány (protahovány) vytahujícími se vlákny jejich průměr se nesnížil a byl stanoven na $7,79 \pm 2,61 \mu\text{m}$. Vlákna se přirozeně vyskytovala ve větší míře, jejich nerovnoměrnost se snížila a jejich průměr zůstal téměř stejný jako u předchozí koncentrace, tedy $400 \pm 150 \text{ nm}$. Obr. 11 (F) představuje šestiprocentní hmotnostní koncentraci. Deformované částice, tedy již spíše defekty, dosahovaly průměru $8,59 \pm 4,87 \mu\text{m}$. Počet vláken výrazně vzrostl i jejich průměrná hodnota průměru zaznamenala zvýšení na $540 \pm 220 \text{ nm}$. Obr. 11 (G) zobrazuje produkt zvláknění roztoku o osmiprocentní hmotnostní koncentraci. Ze snímku je vidno, že vláknenné defekty se vyskytují již v menší míře a s dalším zvýšením koncentrace roztoku by patrně vymizely úplně. Při této koncentraci dosahovaly průměru $48,19 \pm 20,17 \mu\text{m}$. Vznikající vlákna dosahovala průměru 1100 ± 460 .

Statistické hodnocení

Statistické vyhodnocení probíhalo stejným způsobem jako u předchozího experimentu (viz kapitola 3.1.1.2). Stanovené statistické údaje pro částice i vlákna jsou umístěny v tabulkách 5 a 6.

Tab. 5 Statistické údaje velikosti průměru PLC (70:30) částic v závislosti na vzrůstající koncentraci

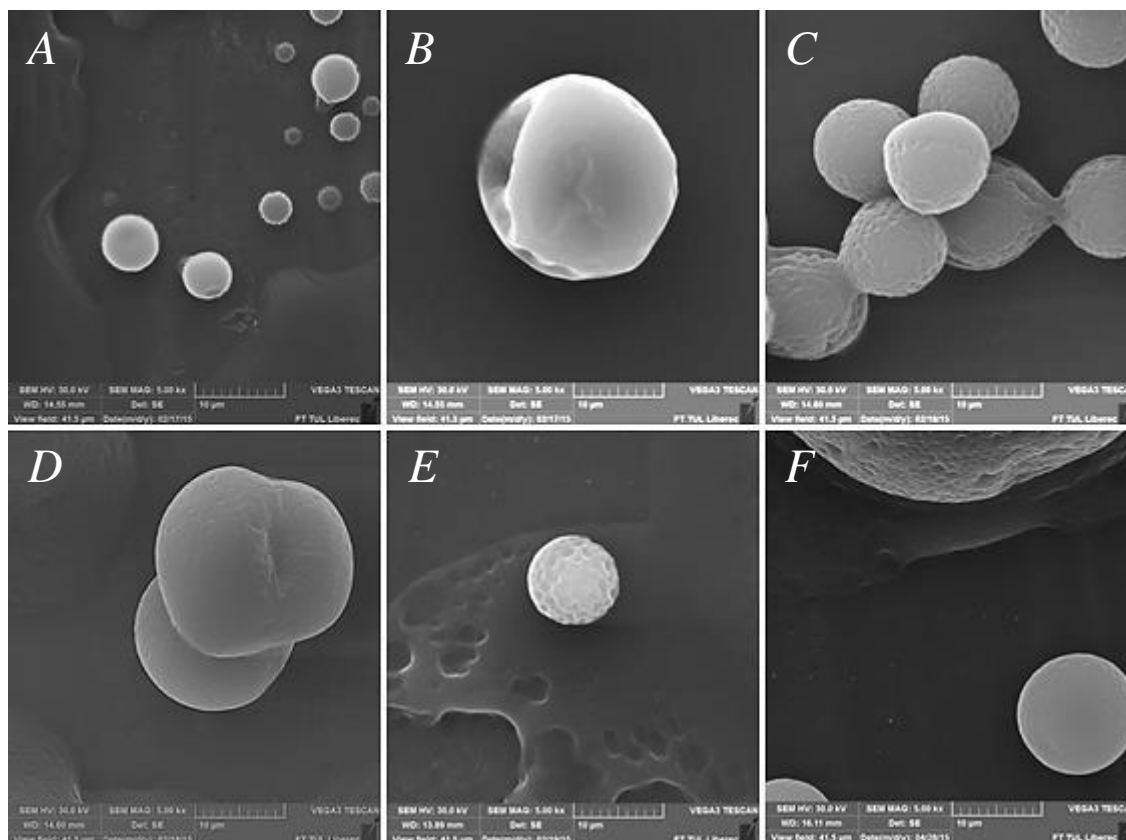
Koncentrace [hm %]	1	2	3	4	5	6	8
Počet měření [-]	-	150	150	150	150	50	40
Aritmetický průměr [μm]	-	3,27	5,52	6,37	7,79	8,59	48,18
Směrodatná odchylka [μm]	-	1,36	2,39	2,64	2,61	4,87	20,17
Minimum [μm]	-	0,93	1,14	1,58	2,67	1,4	14,54
Maximum [μm]	-	6,31	13,18	16,77	13,87	20,48	94,69

Tab. 6 Statistické údaje velikosti průměru PLC (70:30) vláken v závislosti na vzrůstající koncentraci

Koncentrace [hm %]	4	5	6	8
Počet měření [-]	150	150	150	150
Aritmetický průměr [nm]	410	400	540	1100
Směrodatná odchylka [nm]	90	150	220	460
Minimum [nm]	230	110	180	480
Maximum [nm]	820	980	1360	3210

3.1.1.4 Vliv vlhkosti během elektrostatického zvlákňování PLC roztoků na výsledný produkt

V této kapitole bude vyhodnocen experiment, při němž byla během procesu elektrostatického zvlákňování měněna vlhkost, přičemž ostatní podmínky zůstali zachováni (viz kapitola 3.1.1). Byly zvlákňovány PLC (70:30) roztoky o koncentracích 2 hm% a 4 hm %. Následně byly pro obě koncentrace při jednotlivých vlhkostech pořízeny snímky prostřednictvím elektronového mikroskopu. Ty byly následně vizuálně zhodnoceny.



Obr. 12 Snímky z elektronového mikroskopu. Závislost relativní vlhkosti na výsledný produkt během elektrostatického zvlákňování (rozpuštědlo chloroform). 2 hm % - RH 25% (A), 4 hm % - RH 25% (B), 2 hm % - RH 40% (C), 4 hm % - RH 40% (D), 2 hm % - RH 60% (E), 4 hm % - RH 60% (F).
Zvětšení (5000x)

Vizuální hodnocení

Obr. 12 (A) reprezentuje dvouprocentní hmotnostní koncentraci, kdy při zvlákňování byla relativní vlhkost 25 %. Snímek naznačuje, že 25 % vlhkost není pro tvorbu částic ideální, neboť během procesu zvlákňování docházelo k odlučování velkého množství polymeru ze špičky jehly, což na hliníkové fólii vytvářelo souvislý film, na kterém se dopadající částice slévaly. Tento snímek zachycuje jedno z míst, kde k vytvoření filmu nedošlo, a tím bylo možné zformování částic, které vykazují pravidelný sférický tvar. Obr. 12 (B) vyobrazuje čtyřprocentní hmotnostní koncentraci se zachováním podmínek zvlákňování jako v předchozím případě. I zde docházelo ke slévání a tvorbě prakticky souvislého filmu na povrchu Al fólie. K výskytu částic docházelo jen zřídka, a pokud se tak stalo, vykazovaly nepravidelný tvar a výrazné propadliny povrchu směrem k centru částic. Obr. 12 (C) znázorňuje dvouprocentní hmotnostní koncentraci,

kdy během zvlákňování byla relativní vlhkost udržována na 40 %. Tyto částice vykazovaly pravidelný sférický tvar a svými nepatrnými defekty struktury připomínají „golfové míčky“. Více je uvedeno v kapitole 3.1.1.1. Na obr. 12 (D) je zastoupena čtyřprocentní hmotnostní koncentrace, vlhkost byla opět udržována na 40 %. Tyto částice též vykazovaly kulovité tvary, ale docházelo také k nedostatečnému formování částic a jejich roztékání po dopadu na nosnou fólii. Nejpravděpodobnější příčinou bylo nevhodné počáteční nastavení zvlákňovací aparatury. Obr. 12 (E) ukazuje dvouprocentní hmotnostní koncentraci, zvlákňovanou při šedesátiprocentní relativní vlhkosti. Ke vzniku částic docházelo jen sporadicky, převažovalo utváření „slévanců“ s charakteristickou strukturou připomínající povrch měsíce. Vznik zřetelných kráterů ve struktuře slévajících se útvarů způsobila pravděpodobně právě vysoká vlhkost, která mohla způsobit zpomalení odpařování rozpouštědla. Obr. 12 (F) prezentuje čtyřprocentní hmotnostní koncentraci též při RH 60 %. Ani tato koncentrace nevykazovala přílišnou tvorbu částic, pokud se objevovaly, tak jen zřídka a nabývaly kulovitých i deformovaných tvarů. Spíše se vytvářely roztékající se shluky, vzniklé ze stejných důvodů jako u dvouprocentní koncentrace. Nebyly ovšem tak výrazné.

Tato kapitola dokládá podstatný vliv relativní vlhkosti během zvlákňování na výsledný produkt. Nejvhodněji se jeví čtyřicetiprocentní RH, především pro zvlákňování dvouprocentních roztoků PLC (70:30). Na základě této kapitoly a kapitoly 3.1.1.2 bylo pro nadcházející experimenty užíváno dvouprocentní hmotnostní koncentrace a během procesu zvlákňování byla RH udržována na 40 %.

V důsledku opakujících se hmotnostních koncentracích zvlákňovaných při stejných podmínkách, a dále s ohledem na malý počet vznikajících částic nebyla prováděna obrazová analýza a následné statistické vyhodnocování.

3.2 Inkorporace PVA částic do PLC kapslí

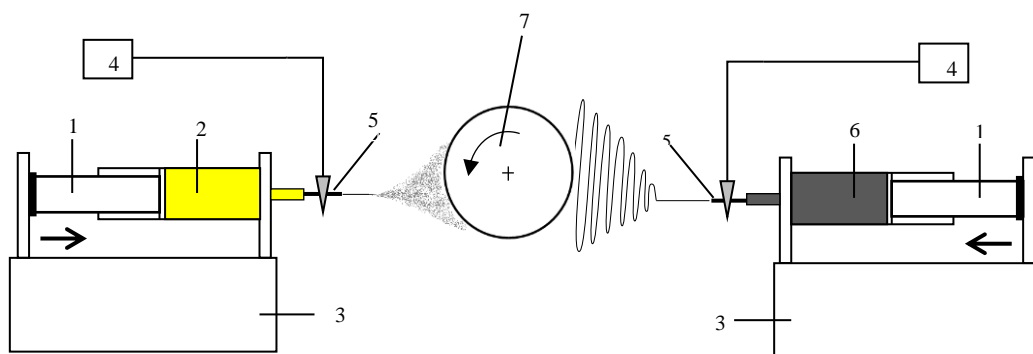
V důsledku nerozpustnosti PVA v chloroformu, který byl používán jako rozpouštědlo k přípravě PLC roztoků, bylo nutné k začlenění PVA částic do PLC zvolit vhodnou metodu. Za tímto účelem bylo využito metody kombinující elektrostatické zvlákňování a elektrostatické rozprašování, čím je docíleno tvorby bifunkčního scaffoldu, který je posléze rozpuštěn a opět nasprejován. Tím dochází k začlenění PVA částic do PLC kapslí.

3.2.1 Příprava roztoků PVA a PLC

K přípravě roztoku polyvinylalkoholu bylo použito PVA o molekulové hmotnosti $47\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ dodávané společností Kuraray. Polymer je v základní formě bezbarvý, v podobě jemných granulek. Rozpouštědlový systém sestával z demineralizované vody a ethanolu v poměru 7:3. Roztok o pětiprocentní hmotnostní koncentraci byl rozmícháván na magnetickém míchadle při teplotě $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu čtyř hodin. Z PLC (70:30) byl s použitím rozpouštědla CHEKO nachystán roztok o osmiprocentní hmotnostní koncentraci. Výběr rozpouštědla byl založen na požadavku tvorby vláken, což tento systém při této koncentraci umožňuje (viz předchozí kapitola 3.1.1.3). Pro snadnější detekci PVA částic a následné studium degradace byly roztoky PVA i PLC obarveny fluorescenčními barvivy – Rhodaminem B dodávaný společností Sigma-Aldrich a Fluorescein-5-isokyanátem (FITC isomer I) dodávaný společností Biotium. Byly vytvořeny tři varianty kapslí s částicemi: PLC (bez aditiv)/PVA (Rhodamin B), PLC (bez aditiv)/PVA (FITC) a PLC (Rhodamin B)/PVA (FITC).

3.2.1.1 Krok první - výrobu bifunkčního scaffoldu

Bifunkční vlákenné vrstvy bylo dosaženo metodou spojující elektrostatické zvlákňování a rozprašování. S ohledem na strukturu vznikajícího produktu též nazývána jako „metoda vánočního stromku“. Jak zachycuje schéma na obr. 13, je to technologický postup, při kterém je mezi dvěma dávkovacími zařízeními naplněných polymery A a B umístěn rotující kolektor, přičemž jedno injekční zařízení vytváří vlákna (polymer B - PLC) a druhé sprejuje částice (polymer A - PVA).



Obr. 13 Schéma laboratorního zařízení kombinující metody elektrostatického zvlákňování a elektrostatického rozprašování. 1 – injekční stříkačka, 2 – polymer A (PVA), 3 – dávkovací zařízení, 4 – zdroj vysokého napětí, 5 – injekční jehla, 6 – polymer B (PLC,), rotující kolektor.

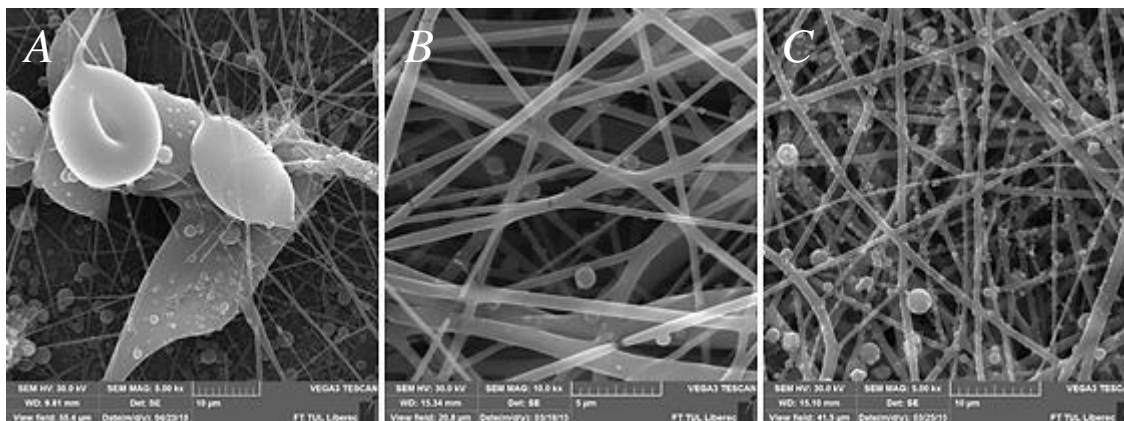
Při experimentu byl jako polymer vytvářející vlákna použit roztok PLC a polymerem, který vytvářel jemné částice, byl PVA. Jejich příprava a modifikace jsou popsány v předchozí kapitole.

Podmínky elektrostatického zvlákňování byly nastaveny pro každý polymer zvlášť. Každé injekční zařízení bylo opatřeno vlastním zdrojem napětí. Pro roztok PLC bylo nastaveno dávkování 5 ml/hod, vzdálenost kolektoru od jehly byla 200 mm a zvlákňování probíhal při napětí 16 kV. Pro roztok PVA bylo dávkování nastaveno velmi nízké 0,5 ml/hod, vzdálenost kolektoru od jehly byla 180 mm a sprejování probíhalo při napětí 25 kV. Klimatické podmínky během procesu byly 23 °C a RH 25 %. Elektrostatické zvlákňování/sprejování probíhalo po dobu 1 hodiny, za účelem zajištění dostatečně silné vrstvy, kterou bylo možné sloupnout z hliníkové fólie, kterou byl opatřen sběrný kolektor. Výsledkem byla vlákenná vrstva sestávající z PLC vláken, na kterých jsou navěšeny PVA částice. Tento bifunkční scaffold je ve svých třech modifikacích zachycen snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu VEGA 3 TESCAN na obr. 14.

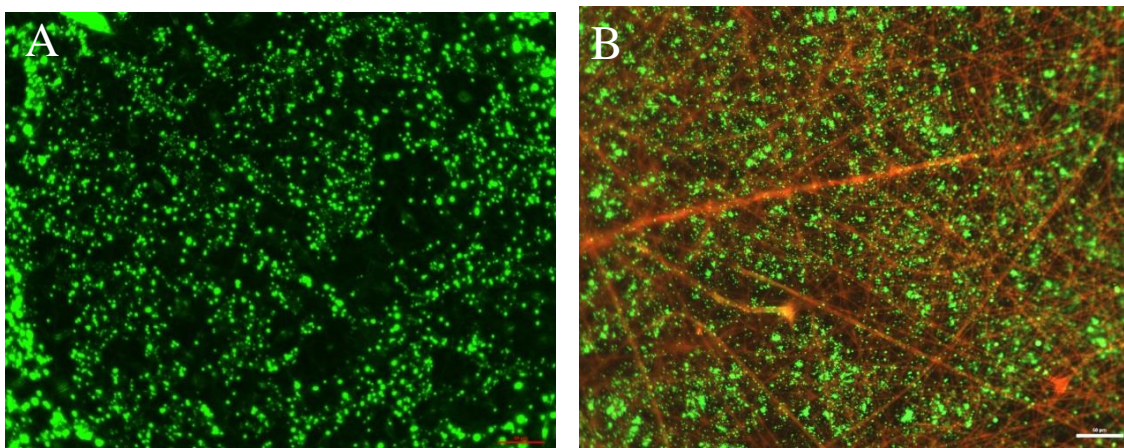
Vizuální hodnocení

Obr.14 (A) tedy zachycuje scaffold připravený z roztoku PLC a PVA obarveného FITCEM. Zde PLC jako u jediného typu nevykazoval ideální tvorbu vláken. Vznikaly časté defekty propletené jemnými vlákny. Obr. 14 (B) potom zachycuje kombinaci PLC vláken a PVA částic zabarvených Rhodaminem B. Ze snímku je vidět, že v tomto případě již PLC tvořil poměrně pravidelnou vlákennou strukturu. Nakonec obr. 14 (C), představuje vlákennou vrstvu z PLC, obarveného Rhodaminem B a PVA částic, zabarvených FITCEM. I tady vytvářel PLC pravidelná vlákna, která byla ověšená PVA sférami.

Tytéž modifikace bifunkčního scaffoldu (bez varianty PLC (vlákna) a PVA (částice) obarvené Rhodaminem) reprezentují snímky (A) a (B) na obr. 15, ovšem s tím rozdílem, že byli zhotoveny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse *Ti*. Přičemž pro každý snímek bylo použito prosvícení o jiné vlnové délce, neboť každé z barviv reaguje na jiné světlo. Mikroskop, na kterém byly snímky pořízeny umožňuje prosvícení a tvorbu výsledného obrazu pomocí UV, zeleného a modrého světla, případně je možná i kombinace těchto světél (vznik tzv. vícekanálový obraz).



Obr. 14 Snímky z elektronového mikroskopu zachycující tři modifikace bifunkčního scaffoldu připravený kombinací electrospinningu PLC a electrospayingu PVA roztoků. (A) PLC (bez aditiv)+PVA (FITC), (B) PLC (bez aditiv)+PVA (Rhodamin B), (C) PLC (Rhodamin B)+PVA (FITC)
(Zvětšení: 5000x (A,C); 10000x (B)).



Obr. 15 Snímky dvou modifikací bifunkčního scaffoldu z fluorescenčního mikroskopu. (A) PLC (bez aditiv)+PVA (FITC), (B) PLC (Rhodamin B)+PVA (FITC). Zvětšení (200x).

Statistické hodnocení

Základní statistické zhodnocení v podobě, průměru, směrodatné odchylky, minimální a maximální hodnoty částic a vláken/defektů, které byly zjištěny pomocí obrazové analýzy, jsou zaneseny v tabulkách 7 a 8. Bylo prováděno sto a více měření.

Tab. 7 Statistické údaje velikosti průměru PLC vláken v bifunkční scaffoldu.

Typ scaffoldu	PLC + PVA (FITC) (A)		PLC + PVA (Rhodamin) (B)	PLC(Rhodamin) + PVA (FITC) (C)
	defekty	vlákna		
Počet měření [-]	100	150	100	150
Aritmetický průměr [nm]	12680	380	520	720
Směrodatná odchylka [nm]	2740	130	240	300
Minimum [nm]	601	180	140	140
Maximum [nm]	19680	930	1340	1820

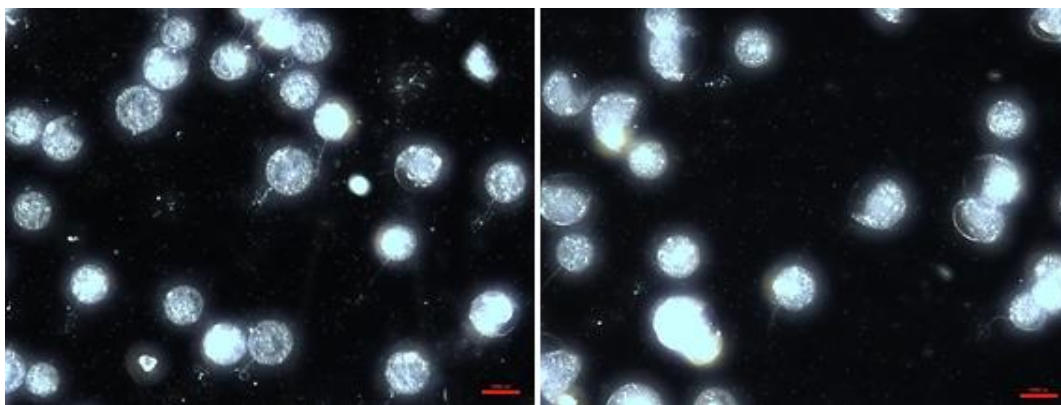
Tab. 8 Statistické údaje velikosti průměru PLC částic v bifunkční scaffoldu.

Typ scaffoldu	PCL + PVA (FITC) (A)	PLC + PVA (Rhodamin) (B)	PLC(Rhodamin) + PVA (FITC) (C)
Počet měření [-]	150	100	150
Aritmetický průměr [nm]	820	370	780
Směrodatná odchylka [nm]	510	200	420
Minimum [nm]	220	100	270
Maximum [nm]	260	1310	290

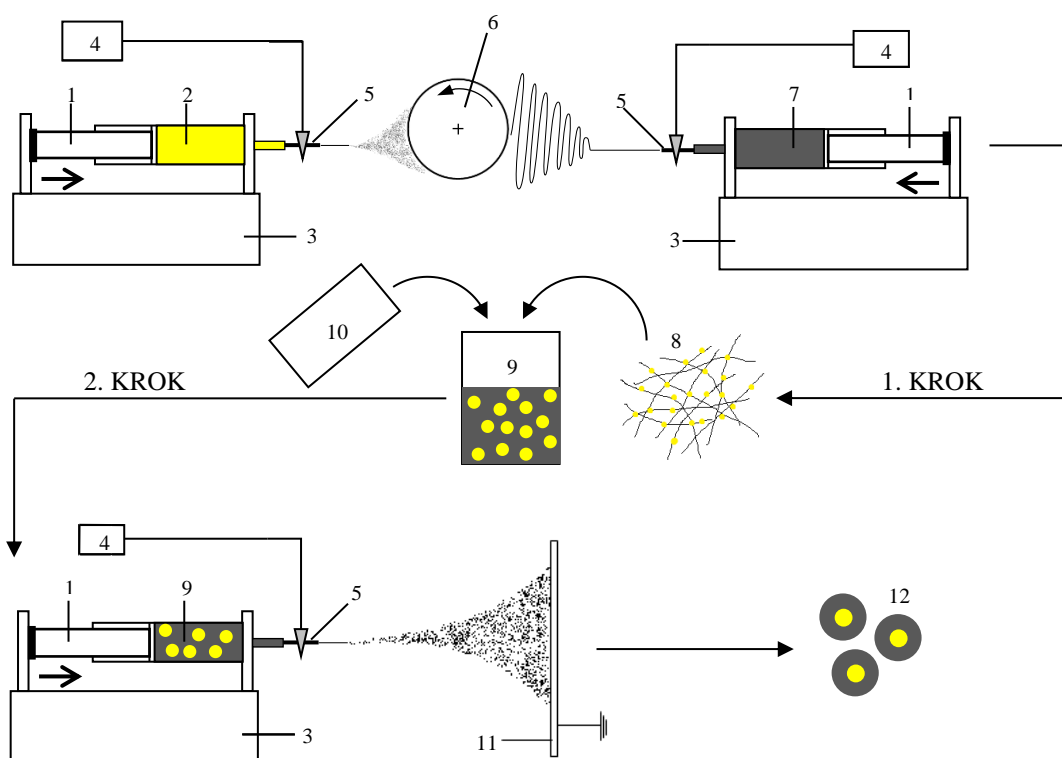
3.2.1.2 Krok druhý - elektrostatické zvlákňování PLC/PVA roztoku z jehly

Bifunkční scaffold vznikající výše popsanou metodou byl jakožto „granulát“ rozpuštěn v čistém chloroformu. Po rozmíchání na magnetickém míchadle vznikl 2 % roztok PLC/PVA, který bylo nutné vystavit pomocí ultrazvukového sonikátoru Qsonica ultrazvukovým vlnám, za účelem minimalizace agregování PVA částic. I přesto k agregaci částečně docházelo, to dokládají snímky roztoku PLC/PVA zobrazené na obr. 17. Tento roztok byl poté opět zvlákňován z jehly, tím bylo docíleno zapouzdření PVA částic do PLC kapslí, vznikaly kapsle v kapslích, kdy PVA tvořily jádro a zároveň

první kapsli a PLC tvořily obal a druhou kapsli. Podmínky zvlákňování byly následující: dávkování bylo nastaveno na 1 ml/hod, vzdálenost kolektoru od jehly byla 260 cm a zvlákňování probíhalo při napětí 25 kV, teplotě 23 °C a RH 28 %. Postup celého experimentu (i s přípravou bifunkčního scaffoldu) schematicky zachycuje obr. 18.



Obr. 17 Snímek z optického mikroskopu Nikon. Roztok PLC/PVA (FITC). Zvětšení (300x)

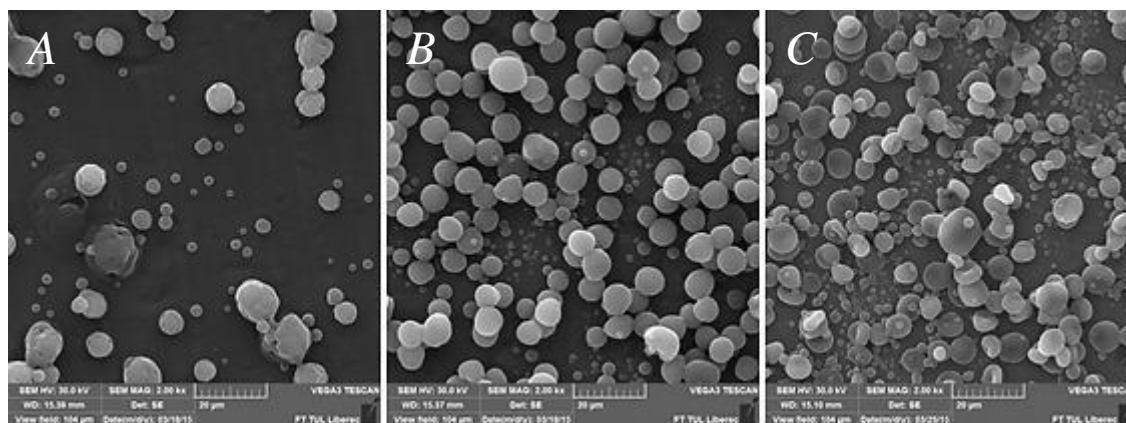


Obr. 18 Schéma celkové technologie začleňování PVA částic (kapslí) do PLC kapslí. 1 - injekční stříkačka, 2 – 5 hm % PVA, 3 – dávkovací zařízení, 4 – zdroj vysokého napětí, 5 – injekční jehla, 6 – rotující kolektor, 7 – 8 hm % PLC, 8 – bifunkční scaffold, 9 – 2 hm % PLC/PVA, 10 – rozpouštědlo (chloroform), 11 – uzemněný kolektor, 12 – kapsle v kapsli.

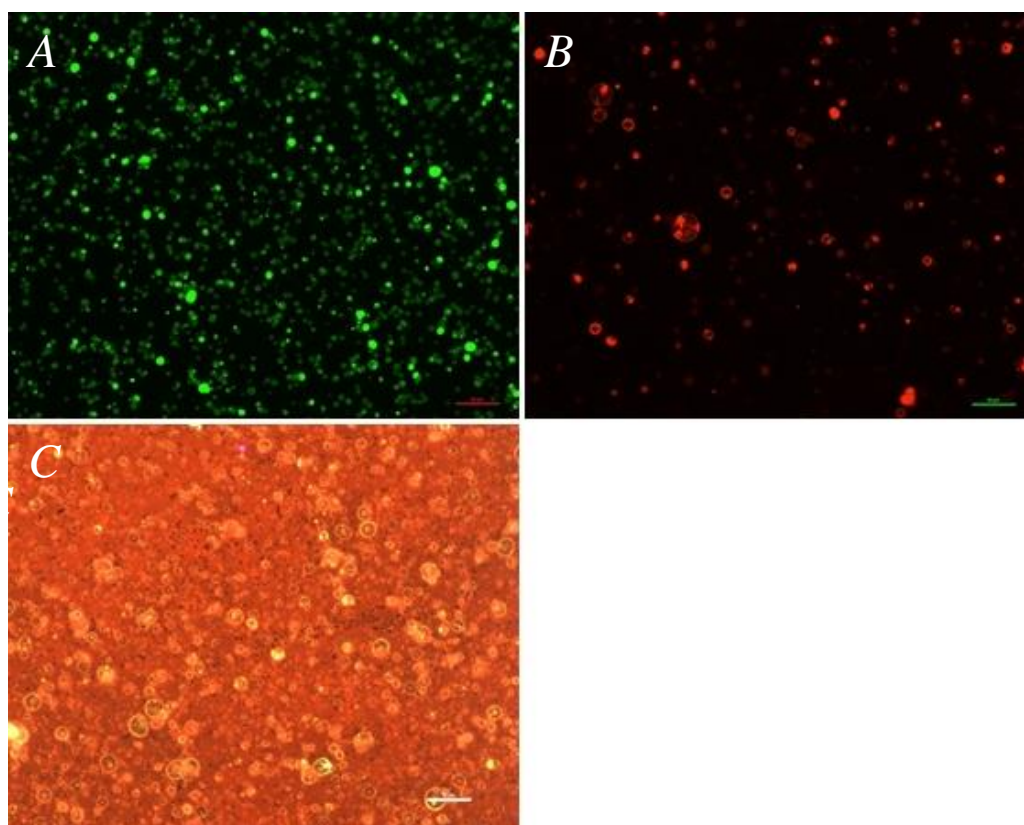
Vizuální hodnocení

Výsledek druhého kroku, tedy opětovným nasprejováním třech variant PLC/PVA roztoků, byly vrstvy částic, které představují snímky na obr. 19. Obr. 19 (A) zachycuje částice nasprejované z roztoku PLC + PVA obarveného FITCEM. Výrobnost částic byla oproti následujícím dvěma roztokům značně nižší a částice se vyznačovaly nepravidelným tvarem s výraznými propadlinami povrchu směrem k centru částic. Na obr. 19 (B) jsou ukázány částice nasprejované z PLC + PVA obarveného Rhodaminem B. Tyto částice se vyznačovaly velice pravidelným tvarem, byly bez defektů a propadlin povrchu. Obr. 19 (C) představuje opětovný spraying roztoku PLC obarveného Rhodaminem B + PVA obarveného FITCEM. I tyto částice byly poměrně pravidelné s širokou distribucí průměru. Jako jediné vykazovaly zploštělý tvar a občasné propadliny ve středu částic, podobající se defektům, které způsobuje kyselina octová obsažená v rozpouštědlovém systému CHEKO.

Snímky (A), (B) a (C) na obr. 20 představují totéž jako snímky předchozí ovšem s tím rozdílem, že byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse *Ti*. Přičemž pro obr. 20 (C) bylo použito kombinované prosvícení vzorku a vznikl vícekanálový obraz. Všechny snímky vypovídají o určitém úspěchu experimentu, neboť částice se vyskytují v oblastech PLC kapslí, ovšem není zcela průkazné, kde přesně se PVA částice v kapslích nacházejí. Některé kapsle vykazovaly přítomnost částic pouze v jedné polovině své struktury, u jiných je patrné, že se nacházejí v blízkosti stěn kapslí a část z nich ulpívala pouze na povrchu. Částice ulpívající na povrchu lze považovat za nedokonalost zapouzdření, ovšem důležitá je skutečnost, že se PVA částice zcela neodlučovaly od PLC kapslí. Jak dokládají snímky na obr. 20, stejně jako při rozpuštění i po opětovném nasprejování docházelo určité agregaci částic, to ovšem není při uvolňování začleněné látky překážkou.



Obr. 19 Snímky nasprejovaných roztoků PLC/PVA roztoků v různých variantách z elektronového rastrovacího mikroskopu. (A) PLC (bez aditiv)/PVA (FITC), (B) PLC (bez aditiv)/PVA (Rhodmin), (C) PLC (Rhodamin)/PVA (FITC). Zvětšení (2000x)



Obr. 20 Snímky nasprejovaných roztoků PLC/PVA v různých variantách z fluorescenčního mikroskopu. (A) PLC (bez aditiv)/PVA (FITC), (prosvíceno modrým světlem), (B) PLC (bez aditiv)/PVA (Rhodmin), (prosvíceno zeleným světlem), (C) PLC (Rhodamin)/PVA (FITC), (vícekanálový obraz – prosvíceno UV, modrým a zeleným světlem). Zvětšení (2000x)

Statistické hodnocení

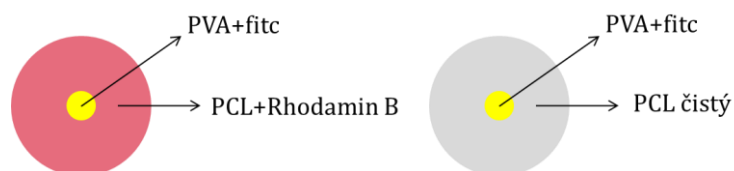
Obrazovou analýzou byly určeny následující základní statistické parametry: průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota. Bylo provedeno sto padesát měření pro všechny typy částic. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 9.

Tab. 9 Statistické údaje velikosti průměru PLC+PVA částic v různých modifikacích

Typ částic	PLC + PVA (FITC)	PLC + PVA (Rhodamin)	PLC (Rhodamin)+ PVA (FITC)
Počet měření [-]	150	150	150
Aritmetický průměr [μm]	4,44	3,73	3,47
Směrodatná odchylka [μm]	2,4	2,72	2,28
Minimum [μm]	0,79	0,67	0,79
Maximum [μm]	13,92	8,95	9,21

3.3 Studium kinetiky uvolňování začleněných PVA částic

Jeden z hlavních parametrů charakterizujících systémy cílené dopravy léčiv je nepopíratelně rychlost uvolňování začleněných léčivých složek z nanovláknového či jiného podpůrného nosiče. A právě kinetikou uvolňování inkorporované aktivní látky (PVA) se zabýval následující experiment. Byl založen na tvorbě dvou typů vzorků PLC kapslí s inkorporovanými obarvenými PVA částicemi, jak je vidět na obr. 21, za pomoci již dříve popsané kombinované metody. Tyto vzorky byly následně podrobeny enzymatické degradaci vlivem proteinázy K v pufracím roztoku Tris o pH 8. Proteináza K byla dodána firmou Genaxxon Bioscience a její specifická aktivita byla 30 U/mg. Zásobní roztok Trisu byl připraven dle předpisu uvedeného v příloze 5. Degradace způsobila destrukci PLC kapslí, a tím docházelo k uvolňování a rozpouštění PVA částic, potažmo barviva. Během degradace proto byly pravidelně odebírány degradační roztoky, které byly následně proměřeny na spektrofotometru GBC Cintra 202. Získané hodnoty absorbance barviva, vyloučeného do degradačního roztoku, byly vyhodnoceny na základě kalibračních křivek absorbance Rhodaminu B a FITCU, v závislosti na koncentraci vyloučeného barviva.

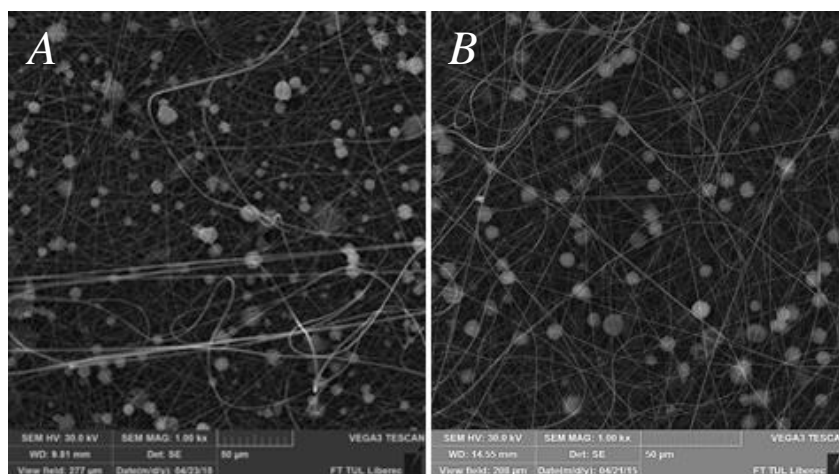


Obr. 21 Schéma dvou druhů připravovaných částic. (A) PLC kapsle obarvené Rhodaminem B obsahující PVA kapsli obarvenou FITCEM, (B) PLC kapsle (bez aditiv) obsahující PVA kapsli obarvenou FITCEM.

3.3.1 Příprava vzorků se začleněným PVA

Příprava vzorků pro studium uvolňování začleněného PVA do PLC kapslí byla v podstatě úplně stejná jako při tvorbě PLC nosiče s inkorporovanými PVA kapslemi (viz předchozí kapitola 3.2.1). Rozdílem bylo, že po rozpuštění PLC/PVA vláknenné vrstvy nebyl roztok nasprejován samostatně, ale bylo opět využito kombinované metody, kdy se nosičem pro PLC/PVA kapsle stal polyvinylbutyral B 60 H s molekulovou hmotností $60\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, dodaný firmou Kuraray. PVB byl zvolen z důvodu odolnosti vůči vodě, potažmo pufracímu roztoku a proteináze K. Vytvořené vláknenné vrstvy zachycuje obr. 22, kde 22 (A) představuje PVB vláknennou vrstvu a PLC/PVA částice, přičemž PVA byl obarven FITCEM. Obr. 22 (B) zachycuje strukturu opět PVB vláknenné vrstvy společně s PLC/PVA částicemi, kdy PLC bylo zabarveno Rhodaminem a PVA FITCEM.

Ze zvlákněno/nasprejovaných vrstev PVB + PLC/PVA + dané barvivo byly nastříhány vzorky 30x70 mm. Ty byly jednotlivě vloženy do plastových šroubovacích zkumavek.



Obr. 22 Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu. (A) PVB vláknenná vrstva + PLC/PVA (FITC) částice, (B) PVB vláknenná vrstva + PLC (Rhodamin B)/PVA (FITC) částice. Zvětšení (1000x).

3.3.2 Enzymatická degradace

Byly provedeny dva experimenty, jednodenní a třídenní. Přičemž pro každý z nich byl zvolen odlišný počet jednotek proteinázy K, určené k degradaci vzorků.

Jednodenní test – hodinový

Pro jednodenní test bylo vytvořeno vždy po třech vzorcích + dvou negativních kontrolách od obou typů vytvořených vrstev (PVB+PLC/PVA (FITC), PVB+PLC (Rhodamin)/PVA (FITC)). Vzorky uložené v plastových zkumavkách byly následně doplněny o 5 ml roztoku Trisu s požadovaným množstvím enzymu a negativní kontroly pouze o roztok Trisu. Množství jednotek proteinázy bylo stanoveno na 1 U/ml, proto, vzhledem k specifické aktivitě proteinázy K, bylo na počátku experimentu tedy zapotřebí 1 mg enzymu. Ten byl rozmíchán v 30 ml Trisu a rozdělen do šesti vzorků. Po jedné hodině byly dva vzorky odebrány, taktéž degradační roztoky. Zbývající vzorky byly propláchnuty a byly opatřeny novým pufracním roztokem s proteinázou, stejně tak byl vyměněn i Tris u negativních kontrol. Množství proteinázy se tedy s ubývajícím množstvím vzorků snižovalo, nejprve na 0,67 mg. Po další hodině se postup opakoval. Byla nachystána poslední dávka Trisu s 0,33 mg proteinázy. Po uplynutí jedné hodiny byl test ukončen. Odebrané degradační roztoky, obsahující vyloučené barvivo, byly uschovány a následně proměřeny na spektrofotometru GBC Cintra 202 a z uschovaných vzorků byly pořízeny snímky na rastrovém elektronovém mikroskopu.

Třídenní test

V případě tohoto testu byly taktéž nachystány tři vzorky od obou typů vrstev + dvě negativní kontroly. Experiment probíhal s drobnými obměnami. Vzorky a degradační roztoky byly odebírány po 24 hodinách a byla použita $\frac{1}{2}$ jednotky proteinázy na jeden mililitr. Pro každý den bylo stanoveno nové množství enzymu, stejně jako pro 1U/ml, bylo však rozředěno dvojnásobným množstvím pufracního roztoku. Jinak pokus probíhal naprosto stejným způsobem. Odebrané degradační roztoky byly opět proměřeny na spektrofotometru a ze vzorků degradovaných vrstev byly zhotoveny snímky na rastrovacím elektronovém mikroskopu.

3.3.3 Vyhodnocení rychlosti uvolňování začleněného PVA

Vyhodnocení kinetiky uvolňování inkorporovaného PVA probíhalo pomocí analýzy dat absorbancí barviv získaných na spektrofotometru GBC Cintra 202. Před samotným proměřováním degradačních roztoků bylo nutné stanovit kalibrační křivky absorbance v závislosti na koncentraci barviva. Dvojkovým ředěním byla vytvořena kalibrační řada roztoků jednotlivých barviv v pufracním roztoku Tris. Ty byly proměřeny spektrofotometrem a následně byly zkonstruovány grafy závislosti absorbance na koncentraci pro FITC a kombinaci FITCU a Rhodaminu B, kdy osu x tvořily absorpční maxima dílčích roztoků z kalibrační řady, ta se nacházela nad sebou v jediném bodě vlnové délky pro dané barvivo. Osu y tvořily koncentrace barevné složky příslušící dané maximální hodnotě absorbance. Ke každé vytvořené křivce byla připojena lineární spojnice trendu. Kompletní křivky absorbance (rozmezí viditelného světla) kalibrační řady roztoků pro obě barviva zachycují grafy P7 (C), P7 (D) v příloze 7. Samostatné kalibrační křivky FITCU a Rhodaminu B zachycuje graf P7 (E), uvedený opět v příloze 7. Při vyhodnocování degradačních roztoků byly do kalibračních křivek zaneseny maximální hodnoty absorbance odebraných roztoků, jakožto jednotlivé body a následně byla zkoumána jejich lineární závislost vůči kalibračním křivkám. Díky lineární závislosti absorbance na koncentraci bylo možné určit množství uvolněného barviva během degradace a tudíž zhodnotit rychlost a zároveň plynulost uvolňování začleněné látky.

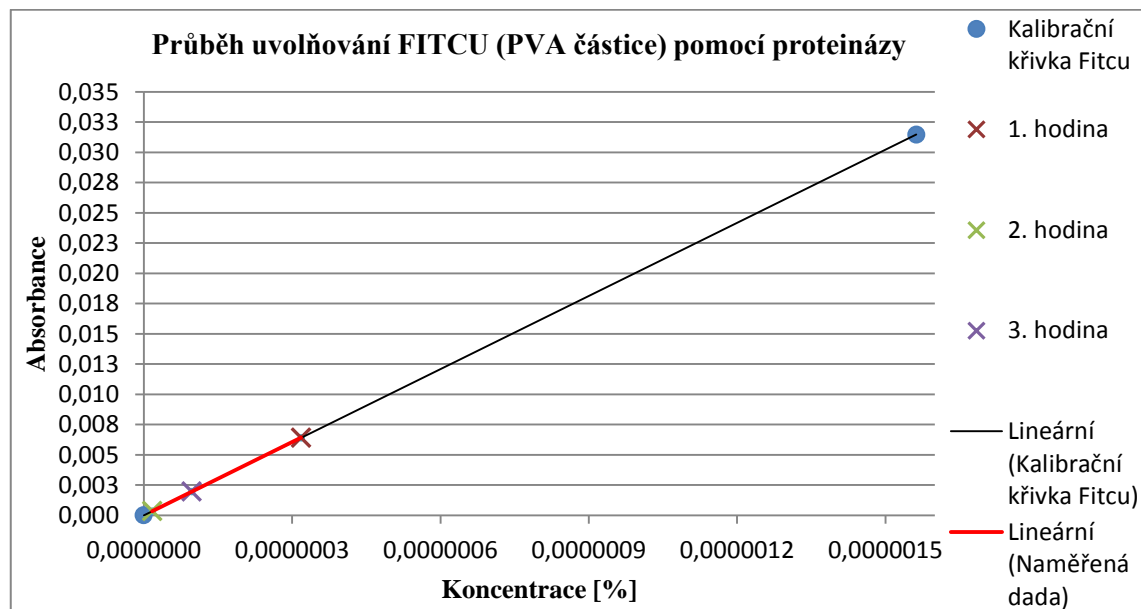
3.3.3.1 Hodinový experiment

Vizuální hodnocení SEM snímků

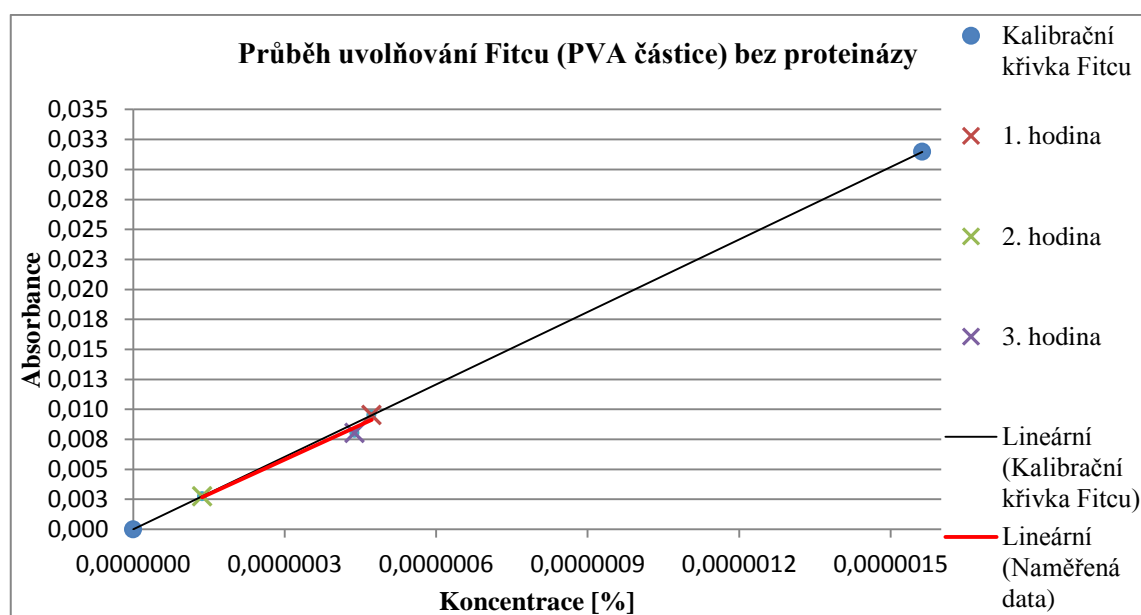
Z řady snímků (A1) až (A3) na obr. P8 uvedeného v příloze 8 je při bližším prozkoumání patrná změna struktury PLC/PVA (FITC) částic. Enzymatická degradace se i přes vyšší počet jednotek enzymu než u třídního experimentu projevovala pouze povrchově, původní propadliny a defekty povrchu částic a shluků částic byly prohlubovány, ale k úplnému rozpadu však nedocházelo. To bylo nejspíše způsobeno krátkým časovým úsekem degradace. Obr. P8 (A4) představuje vzorek, který byl po celou dobu experimentu pouze v pufracním roztoku, představuje tedy negativní kontrolu, kdy je vidět, že struktura zůstala zcela zachována. U částic PLC (Rhodamin B)/PVA (FITC), vyobrazených na obr. P8 (B1) až (B4), SEM snímky

výše popsané chování zcela nedokládají, struktura částic či spíše shluků částic byla značně deformovaná a obsahovala defekty již před degradací.

Studium průběhu uvolňování FITCU z PLC/PVA kapslí



Obr. 23 Graf zachycující vývoj uvolňování FITCU z PLC/PVA částic pomocí proteinázy K.



Obr. 24 Graf zachycující vývoj uvolňování FITCU z PLC/PVA částic v roztoku Trisu bez enzymu.
(Negativní kontrola).

Tab. 10 Naměřené hodnoty absorbance a příslušné koncentrace uvolněného FITCU během tříhodinové degradace za pomoci proteinázy.

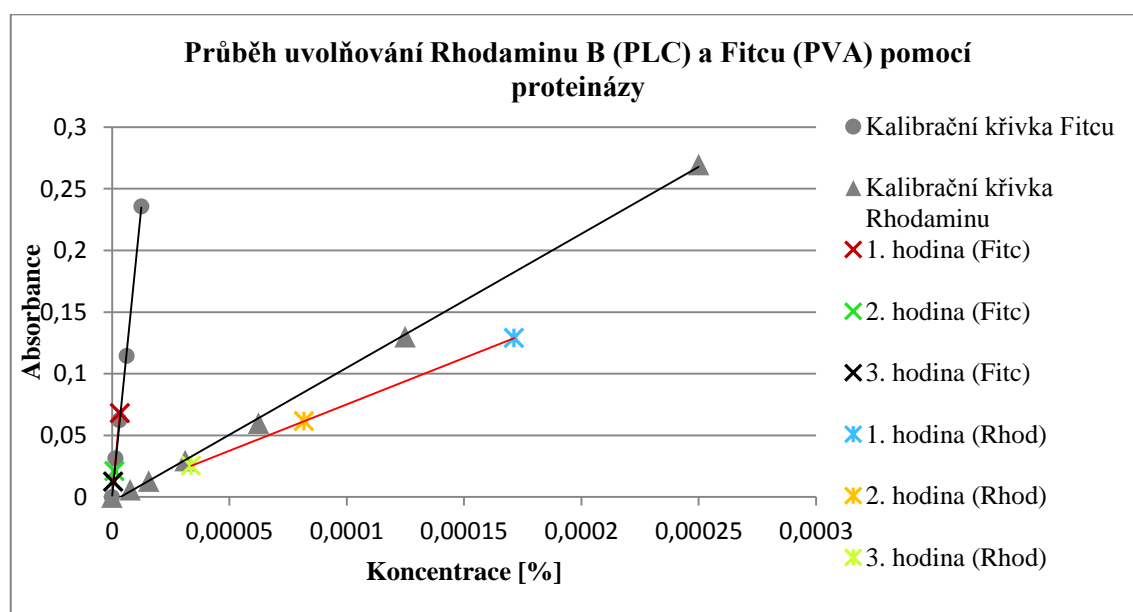
Průběh experimentu	1. hodina	2. hodina	3. hodina
Koncentrace	$3,18 \cdot 10^{-07}$	$1,69 \cdot 10^{-08}$	$9,67 \cdot 10^{-08}$
Max absorbance	0,006406130	0,000341027	0,001948470

Tab. 11 Naměřené hodnoty absorbance a k nim příslušné koncentrace uvolněného FITCU během tříhodinové degradace bez použití enzymu – negativní kontrola.

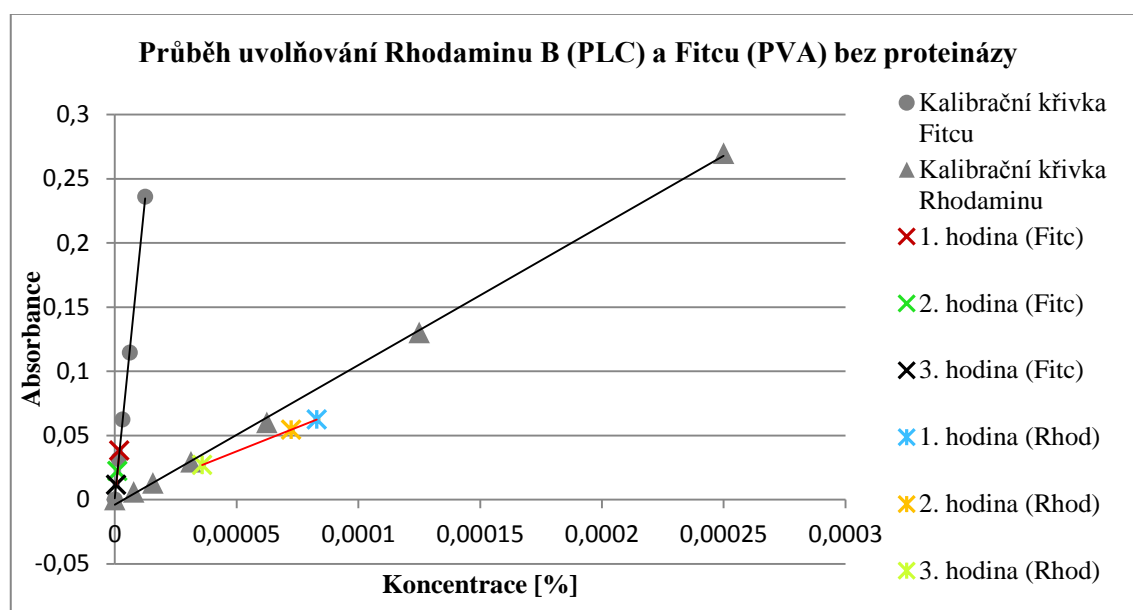
Průběh experimentu	1. hodina	2. hodina	3. hodina
Koncentrace	$4,72 \cdot 10^{-07}$	$1,37 \cdot 10^{-07}$	$4,38 \cdot 10^{-07}$
Max absorbance	0,009515382	0,00272395	0,008026976

Z grafu na obr. 23 je patrné, že v případě vrstvy PVB vláken a PLC/PVA (FITC) částic dochází k největšímu uvolňování obarvené inkorporované látky v první hodině degradace s použitím proteinázy K, což bylo předpokládáno. Ovšem v druhé hodině dochází k výraznému poklesu uvolňování a k nárůstu dochází opět až během třetí hodiny pokusu, ale tato hodnota absorbance již nepřesáhla hodnotu z první hodiny degradace. Maximální hodnoty naměřených absorbancí degradačních roztoků, a k nim příslušné koncentrace vyloučeného barviva, shrnuje tabulka 10. Nečekaná situace nastává v případě negativní kontroly kombinace PVB vláken a PLC/PVA (FITCU) částic, ta byla totiž po celou dobu pouze v pufrčním roztoku, tedy bez enzymu. Předpoklad byl, že k uvolňování bude docházet, ale v zanedbatelné míře. Tento předpoklad se ovšem nepotvrdil, neboť došlo dokonce k většímu uvolnění FITCU během první a třetí hodiny než u vzorků degradovaných roztokem s enzymem, jak ukazuje tabulka 11 a graf na obr 24. To mohlo být způsobeno vlivem nerovnoměrnosti nasprejované vrstvy, vlivem variability částic či nestejnou plošnou hmotností vzorků. Stejně jako v předchozím případě došlo ve druhé hodině experimentu k poklesu uvolňování.

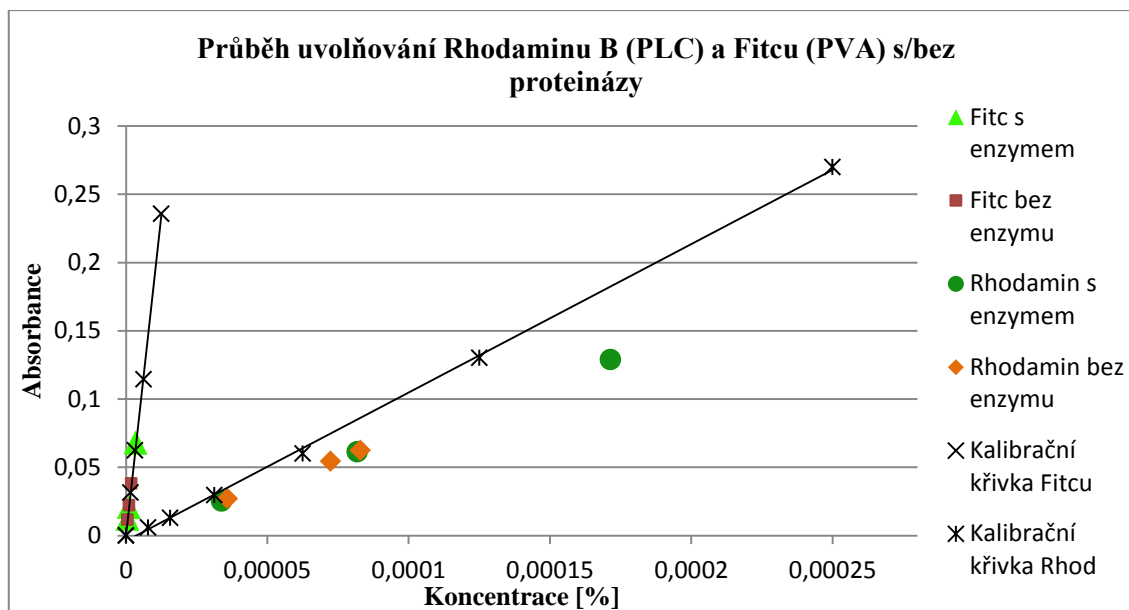
Studium průběhu uvolňování FITCU a Rhodaminu B z PLC/PVA kapslí



Obr. 25 Graf ukazující proces uvolňování Rhodaminu B a FITCU z PLC/PVA částic pomocí proteinázy.



Obr. 26 Graf ukazující proces uvolňování Rhodaminu B a FITCU z PLC/PVA částic v roztoku Trisu bez enzymu. (Negativní kontrola)



Obr. 27 Graf ukazující srovnání procesu uvolňování Rhodaminu B a FITCU z PLC/PVA částic v roztoku Trisu s enzymem i bez enzymu.

Tab. 12 Naměřené hodnoty absorbance a k nim příslušné koncentrace uvolněného FITCU a Rhodaminu B během tříhodinové degradace použitím proteinázy.

Barvivo	FITC			RHODAMIN B		
Průběh experimentu	1. hodina	2. hodina	3. hodina	1. hodina	2. hodina	3. hodina
Koncentrace	$3,378 \cdot 10^{-06}$	$1,0432 \cdot 10^{-06}$	$6,11 \cdot 10^{-07}$	$1,71 \cdot 10^{-4}$	$8,18 \cdot 10^{-05}$	$3,37 \cdot 10^{-05}$
Absorbance	0,0680356	0,02100984	0,012299	0,12887	0,061497	0,02537

Tab. 13 Naměřené hodnoty absorbance a k nim příslušné koncentrace uvolněného FITCU a Rhodaminu B během tříhodinové degradace bez použití proteinázy.

Barvivo	FITC			RHODAMIN B		
Průběh experimentu	1. hodina	2. hodina	3. hodina	1. hodina	2. hodina	3. hodina
Koncentrace	$1,89 \cdot 10^{-06}$	$1,1 \cdot 10^{-06}$	$5,66 \cdot 10^{-07}$	$8,29 \cdot 10^{-05}$	$7,238 \cdot 10^{-05}$	$3,58 \cdot 10^{-05}$
Absorbance	0,038008	0,022179	0,011403	0,06236	0,05443	0,02696

V případě současného uvolňování FITCU i Rhodaminu z kombinované vrstvy PVB vláken a PLC (Rhod)/PVA (FITC) částic, jak ukazuje graf na obr. 25, lze pozorovat, že k největšímu uvolnění obarvené aktivní látky FITCEM a kopolymeru PLC Rhodaminem B dochází opět v první hodině experimentu. V následující hodině

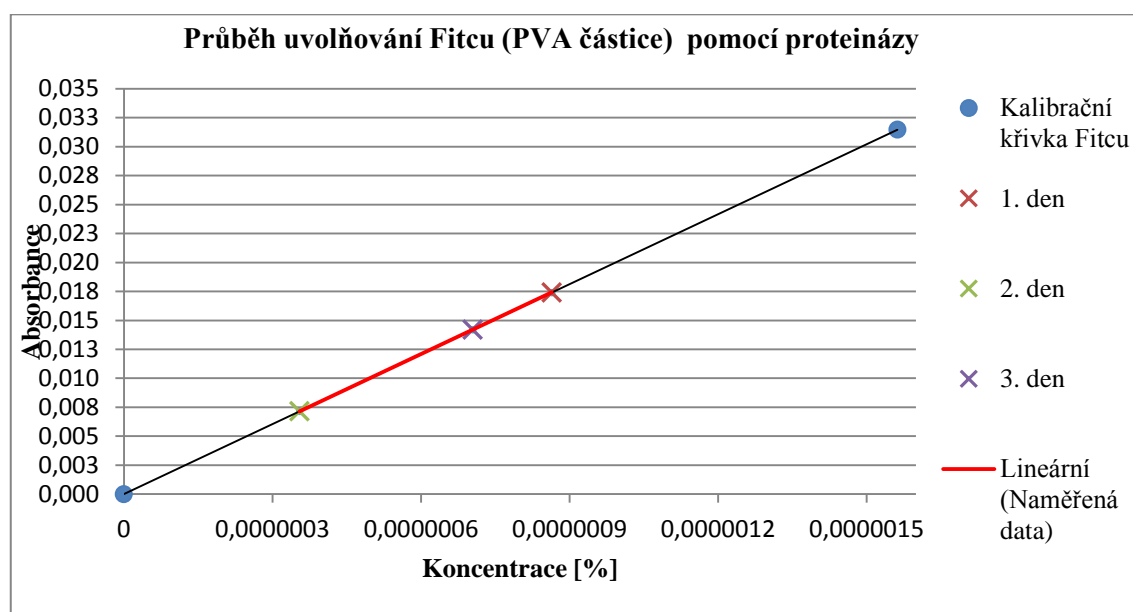
však nedochází k poklesu, naopak uvolňování vykazuje pozvolný průběh až do konce experimentu. Hodnoty absorbancí a příslušných koncentrací uvolněných barviv vlivem degradace za použití proteinázy jsou uvedeny v tabulce 12. Z té je též možné vyčíst, že koncentrace uvolněného FITCU z PVA částic se zvýšilo oproti variantě kapslí PLC/PVA (FITC) o celý řád, což je pravděpodobně způsobeno nerovnoměrným rozmístění PLC/PVA kapslí dopadajících na nosnou vrstvu, ze které byly následně připraveny vzorky pro degradaci. Průběh uvolňování FITCU a Rhodaminu během degradace bez použití enzymu představuje graf na obr. 26, kdy uvolňování barviv vykazuje stejné chování jako uvolňování během degradace s enzymem. Rozdílem oproti předchozí variantě částic je, že vzorky vystavené pouze pufrční lázni nevykazovaly vyšší hodnoty koncentrací uvolněného barviva než vzorky podrobené degradaci vlivem pufru s enzymem. Hodnoty naměřených absorbancí a koncentrací pro vzorky degradované bez použití enzymu jsou uvedeny v tabulce 13. Za účelem srovnání je uveden graf na obr. 27, který ilustruje srovnání průběh obojího uvolňování barviv, jak v Trisu s enzymem, tak v pufrčním médiu bez enzymu.

3.3.3.2 Třídenní test

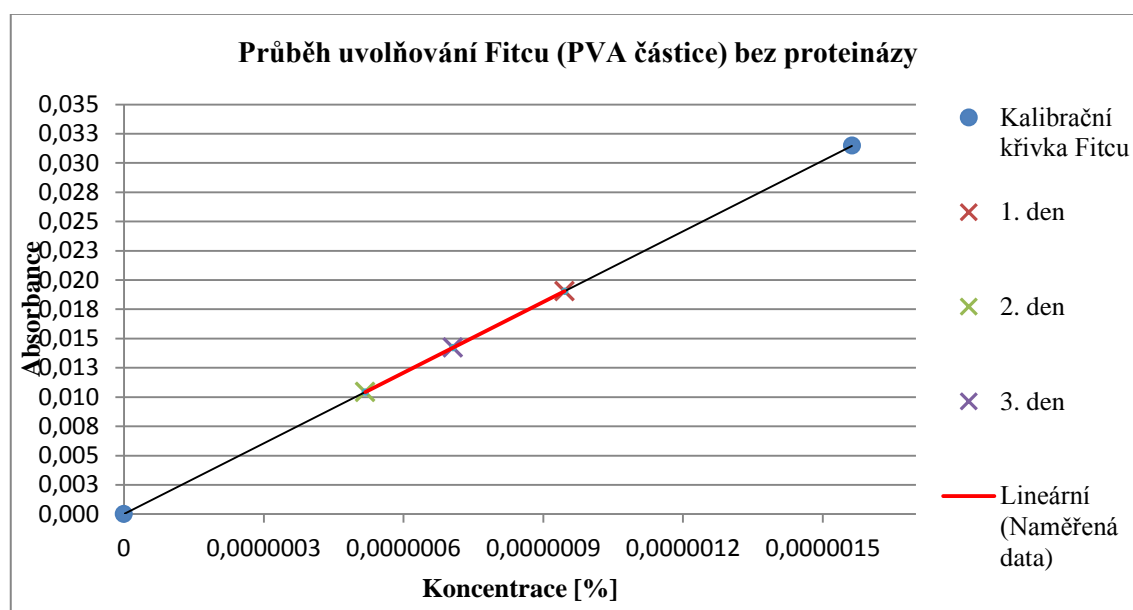
Vizuální hodnocení – třídenní test

Snímky (A1) až (A3) a (B1) až (B3) na obr. P9 uvedené v příloze 9 zachycují průběh třídenní degradace obou typů částic zkoumaných kapslí. Snímky prvního a druhého dne nejsou zcela vypovídající, nejspíše způsobeno přípravou vzorků na SEM. Nicméně snímky třetích dnů jasně vypovídají o téměř dokonalém rozpadu částic, jen místy se objevují nevelké zbytky kapslí. To potvrzují i negativní kontroly na snímcích (A4) a (B4), které dokládají zcela zachovalou strukturu částic.

Studium kinetiky uvolňování FITCU z PLC/ PVA kapslí



Obr. 28 Graf zachycující průběh uvolňování FITCU z PLC/PVA částic pomocí proteinázy K.

Obr. 29 Graf zachycující průběh uvolňování FITCU z PLC/PVA částic v roztoku Trisu bez enzymu.
(Negativní kontrola).

Tab. 14 Naměřené hodnoty absorbance a příslušné koncentrace uvolněného FITCU během třídní degradace za pomoci proteinázy.

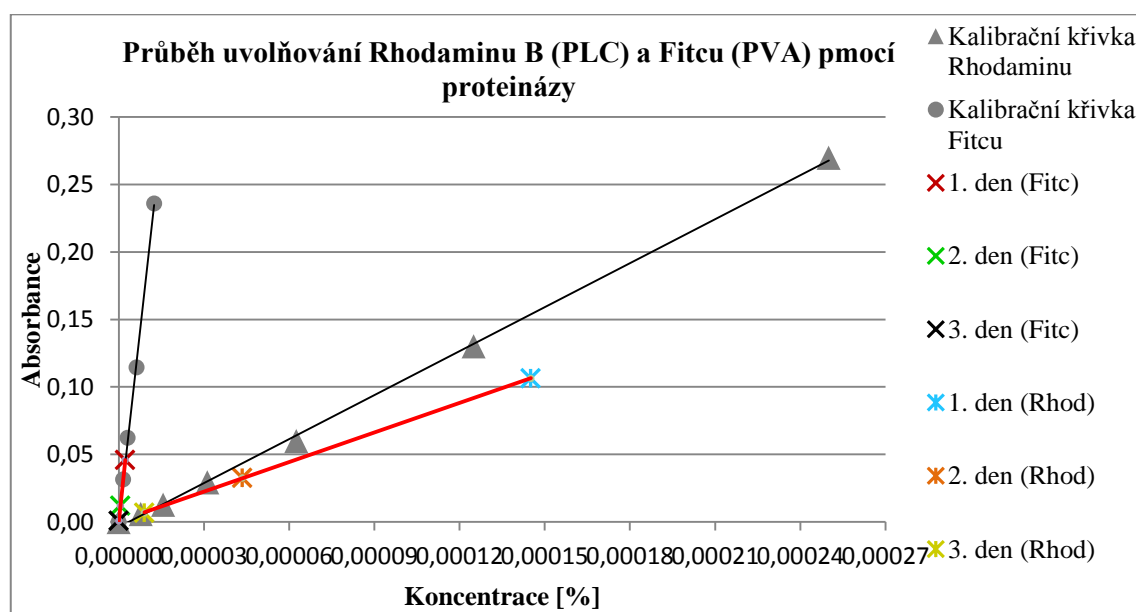
Průběh experimentu	1. den	2. den	3. den
Koncentrace	$8,6427 \cdot 10^{-07}$	$3,5463 \cdot 10^{-07}$	$7,0471 \cdot 10^{-07}$
Max. absorbance	0,017406	0,007142	0,01419249

Tab. 15 Naměřené hodnoty absorbance a k nim příslušné koncentrace uvolněného FITCU během tříhodinové degradace bez použití enzymu.

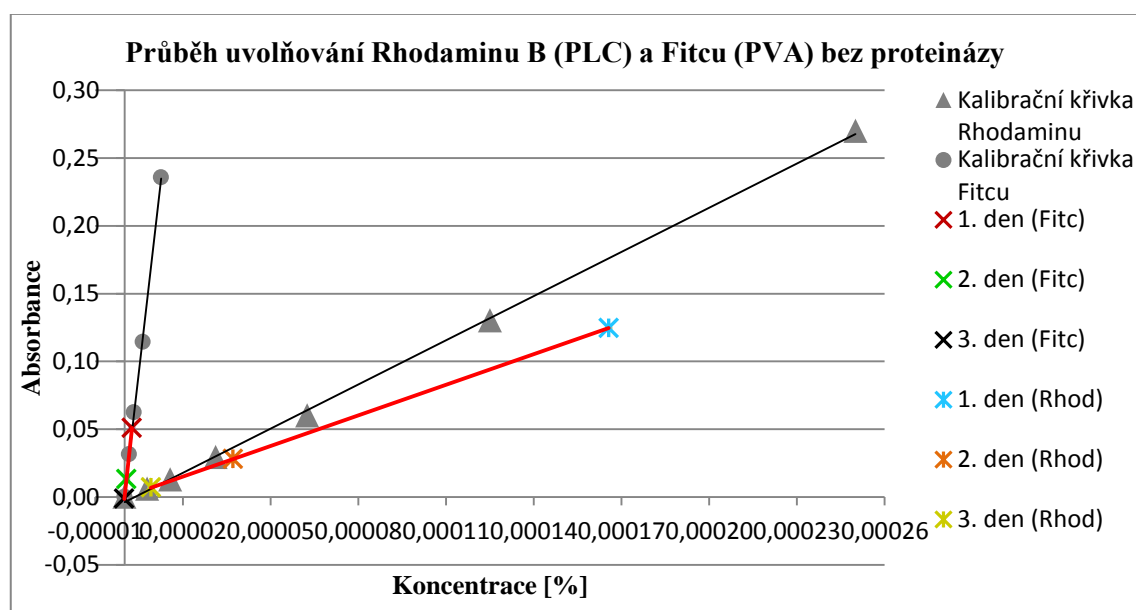
Průběh experimentu	1. den	2. den	3. den
Koncentrace	$9,456 \cdot 10^{-07}$	$5,1784 \cdot 10^{-07}$	$7,0586 \cdot 10^{-07}$
Max. absorbance	0,019044	0,010429	0,0142157

Jak ukazuje graf na obr. 28, tak stejně jako u hodinového experimentu dochází k největšímu uvolňování FITCU z PLC/PVA kapslí za použití proteinázy v první fázi degradace, tedy v prvním dni. Stejně tak dochází i poklesu uvolňování v průběhu dne druhého a ke zvýšení koncentrace vyloučeného barviva, které však nepřesáhne koncentraci uvolněného barviva v prvním dni, nastává opět až třetí den. Podobný průběh uvolňování barviva během degradace PLC/PVA (FITC) částic lze pozorovat i v případě degradace za nepoužití proteinázy, viz graf na obr. 29. Oproti předchozímu experimentu byl i přes menší počet jednotek, oproti předchozímu hodinovému experimentu, zaznamenán nárůst množství uvolněného FITCU do degradačního roztoku. To dokládají naměřené hodnoty absorbancí a koncentrací uvolněného barviva uvedené v tabulkách 14 a 15. Nejpravděpodobnějším vysvětlením se jeví delší časový interval působení degradačního roztoku s enzymem i bez enzymu.

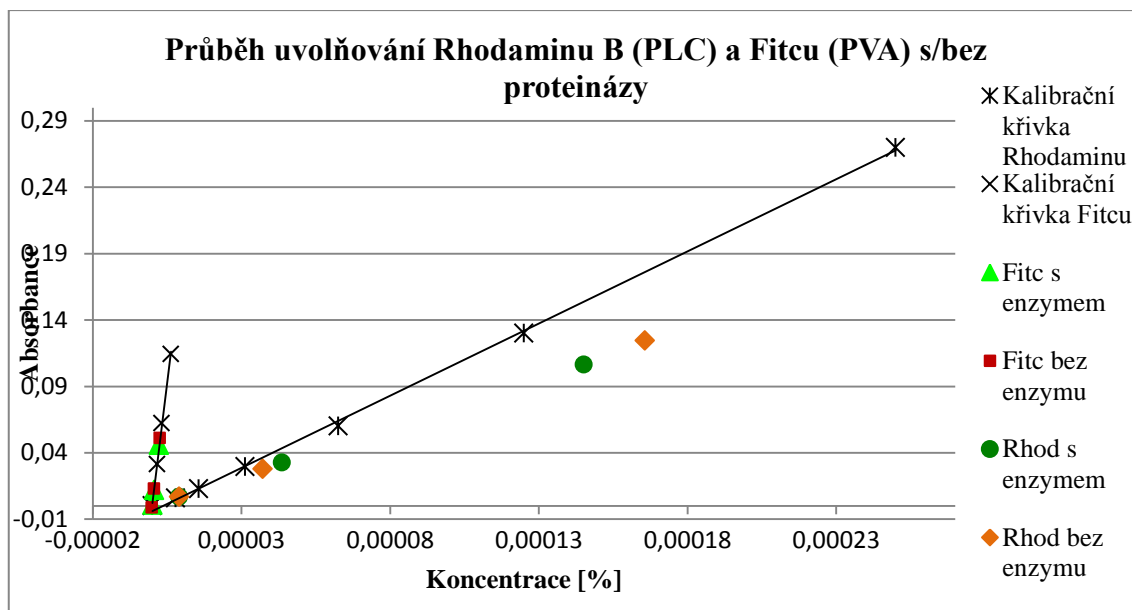
Studium průběhu uvolňování FITCU a Rhodaminu B z PLC/PVA kapslí



Obr. 30 Graf ukazující proces uvolňování Rhodaminu B a FITCU z PLC/PVA částic pomocí proteinázy.



Obr. 31 Graf ukazující proces uvolňování Rhodaminu B a FITCU z PLC/PVA částic v roztoku Trisu bez enzymu. (Negativní kontrola).



Obr. 32 Graf ukazující srovnání procesu uvolňování Rhodaminu B a FITCU z PLC/PVA částic v roztoku Trisu s enzymem i bez enzymu.

Tab. 16 Naměřené hodnoty absorbance a k nim příslušné koncentrace uvolněného FITCU a Rhodaminu B během tříhodinové degradace použitím proteinázy.

Barvivo	FITC			RHODAMIN B		
Průběh experimentu	1. den	2. den	3. den	1. den	2. den	3. den
Koncentrace	$2,279 \cdot 10^{-06}$	$5,926 \cdot 10^{-07}$	$4,369 \cdot 10^{-08}$	$1,45 \cdot 10^{-04}$	$4,35 \cdot 10^{-05}$	$9,06 \cdot 10^{-06}$
Absorbance	0,045906	0,011938	0,000880	0,106412	0,000044	0,006814

Tab. 17 Naměřené hodnoty absorbance a k nim příslušné koncentrace uvolněného FITCU a Rhodaminu B během tříhodinové degradace bez použití proteinázy.

Barvivo	FITC			RHODAMIN B		
Průběh experimentu	1. den	2. den	3. den	1. den	2. den	3. den
Koncentrace	$2,527 \cdot 10^{-06}$	$6,425 \cdot 10^{-07}$	$-6,897 \cdot 10^{-08}$	$1,656 \cdot 10^{-04}$	$3,713 \cdot 10^{-05}$	$9,055 \cdot 10^{-06}$
Absorbance	0,0508889	0,0129395	-0,0013891	0,1245429	0,0279250	0,0068091

V případě varianty uvolňování barviv z PLC (Rhod)/PVA (FITC) částic během degradace s použitím pufrčního roztoku s proteinázou K, je pozorováno podobné chování jako u testu hodinového. K maximálnímu uvolnění obou barviv dochází první den degradace, následující dny se koncentrace uvolněných látek do roztoku pozvolně snižuje až do konce experimentu, jak naznačuje graf na obr. 30 a naměřené údaje

absorbancí a koncentrací zanesených v tabulce 16. Podobným způsobem uvolňování barviv může být pozorován též u negativních kontrol, opět nejvýraznější uvolnění první den pokusu a následný pokles uvolňování až do posledního dne, jak naznačuje graf na obr. 31. Naměřené údaje absorbancí a koncentrací ukazuje tabulka 17. V případě uvolňování FITCU i Rhodaminu při degradaci bez enzymu, byly koncentrace uvolněného barviva během prvního dne překvapivě vyšší než v případě působení enzymu. Následující dny již byla koncentrace uvolněných barviv během degradace za použití proteinázy vyšší než při degradaci bez použití enzymu, u té byla dokonce třetí den naměřena záporná absorbance, tím pádem byla i stanovena záporná koncentrace. To bylo pravděpodobně způsobeno již velice malou koncentrací uvolněného barviva, kdy data ze spektrofotometru velice kolísala.

Celkové hodnocení experimentů

Z výše uvedených výsledků zpracovaných do podoby grafů na obr. 27 až 31 a tabulek 10 až 17 je patrné, že průběh uvolňování FITCU, tedy aktivní začleněné látky jím obarvené, vykazuje silnou lineární závislost, neboť prakticky leží na lineární spojnici trendu kalibrační křivky pro FITC zpracované. Lineární závislost vykazují též data naměřená během uvolňování Rhodaminu B, ovšem projevuje se zde jistý odklon od kalibrační křivky, především u prvního a druhého dne experimentu. To znamená, že při stejné hodnotě absorbance vykazuje degradační roztok uvolněného barviva větší koncentraci než roztok kalibrační, což svědčí o velmi pozitivní degradaci PLC, potažmo uvolnění začleněné aktivní látky (PVA). Jeden z důvodů může být, že se vyloučená barviva vzájemně ovlivňují. Na základě dvou vznikajících peaků v absorpčních křivkách je patrné, že k jejich mísení nedochází, ale k jisté vzájemné reakci docházet může. Doporučením pro nadcházející experimenty tedy je, stanovit kalibrační křivku pro roztok obou barviv dohromady, neboť v případě této práce byly stanoveny jednotlivě pro FITC a Rhodamin B.

Dalším pozitivním poznatkem je, že uvolňování probíhalo postupně, kdy se od prvního dne postupně snižovalo až do konce experimentu. To se sice plně prokázalo pouze u kapslí PLC (Rhod)/PVA (FITC), ale i u částic PLC/PVA (FITC) se dala pozorovat jistá pozvolnost uvolňování, a to i přes výrazný pokles uvolňování během druhého dne. Možné vysvětlení může být spojeno s faktem, že kromě inkorporovaných

částic PVA uvnitř PLC kapslí, byl určitý podíl částic, kdy není známo jak velký, uchycen pouze na povrch kapslí. Ty se nejspíše uvolnily v prvních fázích experimentů, přičemž než došlo k výraznější degradaci, která se výrazně projevila až třetí den, došlo ve druhém dni k poklesu uvolňování. Další možností může být nestejnoměrnost vrstvy, či plošné hmotnosti vzorků. Nárůst koncentrace ve třetí hodině/dni je též možné spojit s faktem, že určitý podíl částic se vyskytoval v těsné blízkosti stěn kapslí, tudíž s počátkem intenzivnější degradace dochází k uvolnění těchto částic, což způsobí skokový nárůst uvolněného barviva.

Předpoklad o uvolňování povrchově vázaných částic PVA lze též považovat jako vysvětlení skutečnosti, že docházelo k velice podobnému uvolňování i u negativních kontrol. Kdy při tří denním experimentu dokonce docházelo k prvnímu dni k vyššímu uvolnění obou barviv. K tomu též může přispívat nerovnoměrnost distribuce PVA částic dopadajících na podkladovou PLC vrstvu v prvním kroku inkorporace, respektive PLC/PVA kapslí dopadajících na PVB vláknennou vrstvu v druhém kroku, z níž byly následně připravovány vzorky určené k degradaci.

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na studium kopolymeru poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) pro případné využití pro medicínské aplikace, především pak pro cílenou dopravu léčiv, jejíž předností je plné využití léčiva a uvolňování pouze na požadovaném místě. Tím zvyšuje efektivitu léčby a zabraňuje komplikacím během zotavování. V rámci této práce byla provedena analýza ovlivňujících vlivů na produkty vznikající působením elektrostatického pole, za účelem nalézt nejvhodnější podmínky pro tvorbu optimálních kapslí vhodných jako nosič inkorporovaných PVA částic.

V prvním experimentu byl zkoumán vliv molekulové hmotnosti a poměru monomerů PLC na výsledný produkt. Vliv obou parametrů se bezpochyby projevil, nicméně poměr monomerů L-Lactide a ϵ -caprolactone nad M_m kopolymeru převážil. Z pozorovaných kopolymerů vykazoval produkci neoptimálnějších částic PLC s M_m 95 000 g·mol⁻¹, neboť bylo předpokládáno, že lepší schopnost tvorby částic budou mít kopolymery s M_m 45 000 – 55 000 g. Ovšem jak se ukázalo, bylo to způsobeno právě poměrem monomerů v kopolymeru. Poměr jednotlivých monomerů výrazně ovlivňuje již strukturu vstupního polymeru a výsledky ukazují, že se to projevuje i ve struktuře výstupního produktu elektrostatického sprejování. Jak bylo uvedeno v rešeršní části, monomer L-lactide je ten, který dodává kopolymeru pevnost a tuhost, naopak monomer ϵ -caprolactone tuhost snižuje a poskytuje tvárnost a pružnost. Proto se u PLC s poměrem 50:50 a hlavně 30:70 nepodařilo dosáhnout takových výsledků jako u PLC 70:30. Částice vykazovaly sférický tvar, ovšem s neostrým přechodem a vyznačovaly se značným sléváním. Naproti tomu PLC 70:30 vykazoval pravidelné sférické částice s ostrým ohraničením.

V další části experimentu byly zkoumány další ovlivňující parametry roztoků, též okolních podmínek při procesu elektrostatického sprejování. Byla zkoumána polymerní řada roztoků o koncentracích 1 až 7 hm% a 8 hm % pro dva rozpouštědlové systémy. Přičemž 2 hm % roztok PLC 70:30 v chloroformu vytvářel při RH 40 % nejvhodnější částice.

Hlavním cílem práce však bylo provést inkorporaci PVA částic do PLC kapslí pomocí metody kombinující elektrospinning a elektrospraying, kdy dochází k tvorbě

kapsle v kapsli, dále pak studium kinetiky uvolňování začleněné látky. Přínosem použité metody k začlenění aktivní látky je především možnost inkorporace takové látky, která je v rozpouštědle použitým pro přípravu polymerního roztoku, tvořícího obal kapsle, běžně nerozpustná, tak jako v případě této práce, kdy PVA není rozpustný v chloroformu, který byl použit k přípravě roztoku PLC. Za účelem efektivní detekce inkorporovaných částic, byl PVA obarven fluorescenčními barvivy (Rhodamin B, FITC). Snímky na obr. 19 vypovídají o částečném úspěchu experimentu. Ukazují PLC kapsle z nichž prosvěcují PVA částice, ovšem nebylo možné určit, kde přesně se částice v těle kapslí nacházejí. Některé kapsle vykazovaly obsah částic pouze jedné poloviny svého objemu, jiné ukazují velké množství částic blízko u stěn kapslí. A v neposlední řadě byl určitý podíl částic ukotven pouze na povrchu, což lze také považovat za kladný výsledek, neboť během sprejování nedocházelo k odlučování PVA částic od PLC kapslí, ale jak ilustrují výsledky experimentů kinetiky uvolňování začleněné látky, jsou pravděpodobnou příčinou uvolňování barviva i v pufrčním roztoku bez přídavku proteinázy K.

Posledním experimentem byl zacílen na studium kinetiky uvolňování začleněných PVA částic. Během hydrolytické degradace kompozitní vrstvy vlivem proteinázy K byly postupně napadány PLC/PVA kapsle, tím docházelo ke štěpení obou polymerů a následnému uvolňování FITC obsaženého v PVA a v druhé variantě FITCU (PVA) i Rhodaminu B obsaženého v PLC. Pro kontrolu byla provedena i degradace pouze v pufrčním roztoku. Proměřením degradačních roztoků odebíraných v pravidelných intervalech byly získány hodnoty maximálních absorbancí jednotlivých roztoků a ty byly následně zaneseny do grafů kalibračních křivek pro FITC a FITC s Rhodaminem B. Z těchto grafů (viz kapitola 3.3.3) je patrné, že k maximálnímu uvolňování dochází v první fázi experimentů (první den/hodina). V případě uvolňování pouze FITCU, pak v průběhu druhého dne/hodiny dochází k poklesu uvolňování a ke zvýšení, až v poslední fázi experimentu. V případě uvolňování obou barviv je průběh uvolňování pozvolný, množství uvolněných látek se postupně od počátku pokusu až do konce snižuje. To svědčí o plynulém uvolňování začleněné látky, což je pro systém cílené dopravy léčiv žádoucí.

Metoda proměřování absorpance degradačních roztoků, použitá pro vyhodnocování kinetiky uvolňování inkorporované látky, se jeví jako vhodný vzor pro rozsáhlejší studie a experimenty.

Doporučení

V případě dalších pokusů by bylo vhodné přejít k výrobě PLC kapslí se začleněnou látkou zvlákňováním ze struny. Tím by se zefektivnila výrobnost a rovnoměrnost distribuce PVA, potažmo PLC/PVA kapslí a snížila by se nerovnoměrnost množství kapslí s aktivní látkou v jednotlivých vzorcích použitých pro stanovení průběhu uvolňování. Dále pak provést při studiu kinetiky uvolňování inkorporované látky větší počet měření, které bude mít větší vypovídající hodnotu. Přínosem by také bylo přesněji stanovit počet jednotek enzymu použitého pro degradaci, kdy se správným množstvím bude průběh degradace předvídatelnější.

LITERATURA

AKKOUCH, A., ZHANG, Z., ROUABHIA, M., (2011). A novel collagen/hydroxyapatite/poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) biodegradable and bioactive 3D porous scaffold for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. Vol. 96A, No. 4, s. 693-704.

BIKIARIS, D. N., (2013). Nanokomposites of Aliphatic Polyesters: An Overview of the Effect of Different Nanofillers on Enzymatic Hydrolysis and Biodegradation of Polyesters. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 98, No. 9, s. 1908-1928.

BOCK, N., DARGAVILLE, T. R., WOODRUFF, M. A., (2012). Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: state of art. *Progress in Polymer Science*. 37(11), s. 1510-1551.

BRAGHIROLI, D. I., STEFFERS, D., PRANKE, P., (2014). Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discovery Today*. Vol. 19, No. 6, s. 743-753.

ELIAS, H. G., (2005). *Macromolecules Volume 1, Chemical structure and syntheses*. Wiley-VCH, 1st ed., 698 s. ISBN-10: 3527311726.

FERNANDÉZ, J., ETXEBERRIA, A., SARASUA, J-R. (2012). Synthesis, structure and properties of poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) statistical copolymers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. Vol. 9, s. 100-112.

FERNANDÉZ, J., MEAURIO, E., CHAOS, A., ETXEBERRIA, A., ALNSO-VARONA, A., SARASUA, J. R., (2013). Synthesis and characterization of poly (l-lactide/ ϵ -caprolactone) statistical copolymers with well resolved chain microstructures. *Polymer*. Vol. 54, No. 11, s. 2621-2631.

GARKHAL, K., VERMA, S., TIKOO, K., KUMAR, N., (2007). Surface modified poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) microspheres as scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. Vol. 82A, No. 3, s. 747-756.

GUPTA, K. K., PAL, N., MISHRA, P. K., SRIVASTAVA, P., MOHANTY, S., MAITI, P., (2014). 5-Fluorouracil-loaded poly(lactic acid)-poly(caprolactone) hybrid scaffold: Potential chemotherapeutic implant. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. Vol. 102, No. 8, s. 2600-2612.

HAIGHI, A. K., (2012). *Electrospinning of Nanofibers in Textiles*, Toronto: Academis Press; eBook Collection, [online]. [cit. 28. 2. 2015].

Dostupné z:

<<http://web.b.ebscohost.com.ipac.kvkl.cz:8080/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzQzNzcwNl9fQU41?sid=2e78e594-92b2-472c-ae87-f18214e02697@sessionmgr110&vid=2&format=EB&rid=1>>

HU, X., LUI, S., ZHOU, G., HUANG, Y., XIE, Z., JING, X., (2014). Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*. Vol. 165, s. 12-21.

JALONEK, K., KASPERCZYK, J., LI, S., DOBRZYNSKI, P., JANECZEK, H., JARZABEK, B., (2013). Novel Poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) Matrices Obtained with the Use of Zr[Acac]₄ as Nontoxic Initiator for Long-Term Release of Immunosuppressive Drugs. *BioMed Research International*. Vol. 2013, 11 s.

JANG, B. S., JUNG, Y., KWON, I. K., MUN, CH. H., KIM, S. H., (2012). Fibroblast Culture on Poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) an Electrospun Nanofiber Sheet. *Macromolecular Research*. Vol. 20, No. 12, s. 1234-1242.

JAWOREK, A., SOBCZYK, A. B., (2014). Electrospinning Route to Nanotechnology: An Overvie. *Journal of Electrostatic*. Vol. 66, No. 3-4, s. 197-219.

JEONG, S. I., KIM, B-S., KANG, S. W., KWON, J. H., LEE, Y. M., KIM, S. H., KIM, Y. H., In vivo biocompatibilty and degradation behavior of elastic poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials*. Vol. 25, No. 28, s. 5939-5946.

JERÓME, CH., LECOMTE, P., (2008). Recent Advances in the synthesis of Aliphatic polyesters by Ring-opening Polymerization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 60, No. 9, s. 1056-1076.

JIANG, H., WANG, L., ZHU, K., (2014). Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents. *Journal of Controlled Release*. Vol. 193, s. 296-33.

KIJEŃSKA, E., PRABHAKARAN, M., SMIESZKOWSKI, W., KURZYDŁOWSKI, K. J., RAMAKRISHNA, S., (2014). Interaction of Schwann cells with laminin encapsulated PLC

core-shell nanofibers for nerve tissue engineering. *European Polymer Journal*. Vol. 50, s. 30-38.

KIM, J. K., PARK, D. – J., LEE, M-S., (2001). Synthesis and crystallization behavior of poly(l-lactide)-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer. *Polymer*. Vol. 42, No. 14, s. 7429-7441.

KIM, M., HONG, B., LEE, J., KIM, S. E., KANG, S. S., HA, Y. K., TAE, G., (2012). Composite System of PLC Scaffold and Heparin-Based Hydrogel for Regeneration of Partial-Thickness Cartilage Defects. *Biomacromolecules*. Vol. 13, No. 8, s. 2287-2298.

KŘÍŽENECKÁ, S., SYNEK, V., (2014). *Základy analytické chemie*. Ústí nad Labem: UJEP. [online]. [cit. 30. 3. 2015].

Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/zach/zach.pdf>

KUMARI, A., YADAV, S., K., YADAV, S., C., (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 75, No. 1, s. 1-18.

KURUPPUSWAMY, P., VENUGOPAL, J. R., NAVANEETHAN, B., LAIVA, A. L., RAMAKRISHNA, S., (2015). Polycaprolactone nanofibers for the controlled release of tetracycline hydrochloride. *Materials Letters*. Vol. 141, s. 180-186.

KWON I. K., KIDOAKI, S., MATSUDA, T., (2005). Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials*. Vol. 26, No. 18, s. 3929-3939.

LAIVA, A. L., VENUGOPAL, J. R., KURUPPUSWAMY, P., NAVANEETHAN, B., GORA, A., RAMAKRISHNA, S., (2015). Controlled release of titanocene into the hybrid nanofibrous scaffolds to prevent the proliferation of breast cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 483, No. 1-2, s. 115-123.

LANZA, R., LANGER, R., VACANTI, J. (2014). *Principles of tissue engineering*. London Elsevier/Academic Press, 4th ed., 1887 s. ISBN 13: 978-0-12-39858-9.

LI, Z., WANG, C., (2013). *One-Dimensional Nanostructures*. Springer Briefs in Materials, [online]. [cit. 20. 3. 2015].

Dostupné z:

<http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783642364266-c2.pdf?SGWID=0-0-45-1386231-p174912752>

LEE, J., TAE, G., KIM, Y. H., PARK, I. S., KIM, S-H., HYUN, S., KIM, S. H., (2008). The effect of gelatin incorporation into electrospun poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility. *Biomaterials*. Vol. 29, No. 12, s. 1872-1879.

LORDEN, E. R., et al., (2015). Mitigation of hypertrophic scar contraction via an elastomeric biodegradable scaffold. *Biomaterials*. Vol. 43, s. 61-70.

MA, P. X., (2004). Scaffolds for tissue fabrication. *Materials today*. Vol. 7, No. 5, s. 30-40.

NAAHIDI, S., JAFARI, M., EDALAT, F., REYMOND, F., KHADEMHOSEINI, A. (2013). Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Vol. 166, No 2, s 182-194.

PAN, J-F., LIU, N-H., SUN, H., XU, F., (2014) Preparation and Characterization of Electrospun PLC/Poloxamer Nanofibers and Dextran/Gelatin Hydrogels for Skin Tissue Engineering. PLoS ONE 9(11) [online]. [cit. 20. 3. 2015].

Dostupné z: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112885>>

POKRYWCZYNSKA M, JUNDZILL A, ADAMOWICZ J, KOWALCZYK T, WARDA K, et al. (2014). Is the Poly (L-Lactide-Co-Caprolactone) Nanofibrous Membrane Suitable for Urinary Bladder Regeneration? PLoS ONE 9(8), [online]. [cit. 20. 3. 2015].

Dostupné z:<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0105295>>

RANA, D., ARULKUMAR, S., VISHWAKARMA, A., RAMALINGAM, M., (2015). *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Academic Press, s. 133-148. ISBN 13: 978-0-12-397157-9.

REIS, C., P., NEUFELD, R., J., RIBERIO, A., J., VEIGA, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. Vol. 2, No 1, s. 8-21.

RŮŽIČKOVÁ, J. (2006), *Elektrostatické zvláknování nanovláken*, Liberec: TUL, 2nd ed., 54 s. ISBN 80-7372-066-3.

SAHA S. K., TSUJI, H., (2006). Effects of rapid crystallization on hydrolytic degradation and mechanical properties of poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone). *Reactive and Functional Polymers*. Vol. 66, No. 11, s. 1363-1372.

SAMBERG, M. E., MENTE, P., HE, T., KING, M. W., MONTEIRO-RIVIERE, N. A., (2014). *In Vitro* Biocompatibility and Antibacterial Efficacy of a Degradable Poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) Copolymer Incorporated with Silver Nanoparticles. *Annals of Biomedical Engineering*. Vol. 42, No. 7, s. 1482-1493.

SHEKHAR, K., MADHU, M. N., PRADEEP, B., BANJI, D., (2010). A Review On Microencapsulation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. Vol. 5, No. 2, s. 58-62.

SCHNABEL, W., (1981). *Polymer Degradation – Principles and Practical Applications*. Munchen, Wien : Hanser International, 227 s. ISBN: 3-446-13264-3.

SILL, T., RECUM, H. A., von, (2008) Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Biomaterials*. Vol. 29, No 13, s. 1989-2006.

SING, R., LILLARD Jr., J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*. Vol. 86, No 3, s 215-223.

TATA, S., et al., (2014). Well-organized neointima of large-pore poly(l-lactic acid) vascular graft coated with poly(l-lactic-co-ε-caprolactone) prevents calcific deposition compared to small-pore electrospun poly(l-lactic acid) graft in a mouse aortic implantation model. *Atherosclerosis*. Vol. 237, No. 2, s. 684-691.

TATA, S., et al., (2014). Vessel Bioengineering – Development of Small-Diameter Arterial Grafts. *Circulation Journal*. Vol. 78., s. 12-19.

TIEPPO, A., BOGGS, A. C., POURJAVAD, P., BYRNE, M. E., (2014). Analysis of release kinetics of ocular therapeutics from drug releasing contact lenses: Best methods and practices to advance the field. *Contact Lens and Anterior Eye*. Vol. 37, No. 4, s. 305-3013.

TOMARO-DUCHESNEAU, C., SAHA, S., MALHOTRA, M., KAHOUILLI, PRAKASH, S. (2012). Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions. *Journal of Pharmaceutics*. Vol. 2013, 19 s.

TOMÍČEK, O., (1958). *Kvantitativní analýsa*. Praha: SZdN, 4th ed., 428 s.

VEJSADOVÁ, L., *Studium využití alifatických polyesterů v tkáňovém inženýrství*. Liberec. Diplomová práce. TU Liberec.

VERGROESEN, P-R., KROEZE, R-J., HELDER, M. N., SMIT, T., (2011). The Use of Poly(L-lactide-co-caprolactone) as a Scaffold for Adipose Stem Cells in Bone Tissue Engineering: Application in a Spinal Fusion Model. *Macromolecular Bioscience*. Vol. 11, No. 6, s. 722-730.

VIERA, A. C., VIERA, J. C., FERRA, J. M., MAGALHÃES, F. D., GUEDES, R. M., MARQUES, A. T., (2011). Mechanical study of PLA–PCL fibers during in vitro degradation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. Vol. 4, No. 3, s. 451-460.

VOET, D., VOET, J. G., (1995). *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1st czech ed., 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.

VROMAN, I., TIGHZERT, L., (2009), Biodegradable Polymers. *Materials*. No. 2, s. 307-344.

WANG, S., MO, X. M., JIANG, B. J., GAO, CH. J., WANG, H. S., ZHUANG, Y. G., QIU, L. J., (2013). Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency. *International Journal of Nanomedicine*. [online]. [cit. 20. 3. 2015].

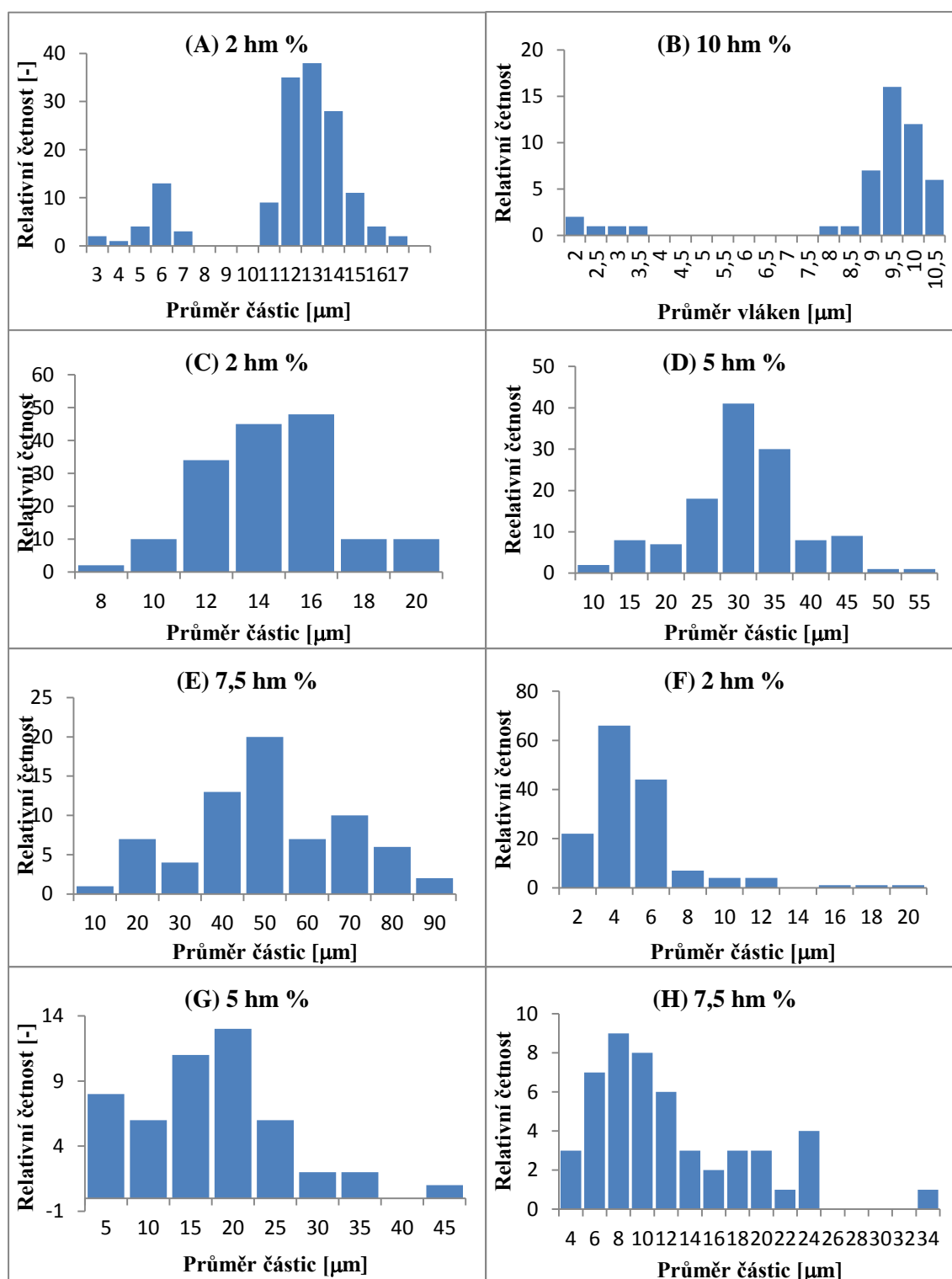
Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3681328/>>

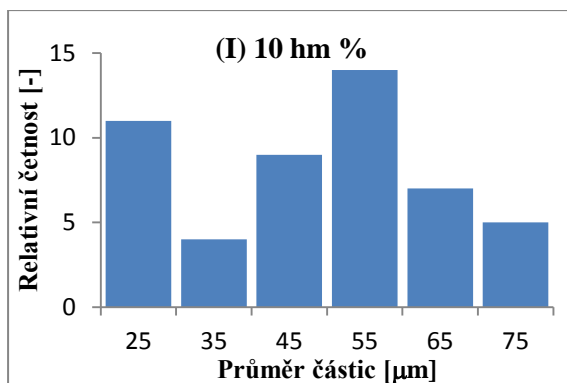
WILCZEWSKA, A., NIEMIROWICZ, K., MARKIEWICZ, K., CAR, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*. Vol. 64, s. 1020-1037. ISSN 1734-1140.

YOU, Y., MIN, B-M., LEE, S. J., LEE, T. S., PARK, W. H., (2005). In Vitro Degradation Behavior of Electrospun Polyglycolide, Polylactide, and Poly(lactide-co-glycolide). *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 95, No. 2, s. 193-200.

ZHU, Y., CHAIN, K. S., CHAN-PARK, M., MHAISALKAR, P. S., RATNER, B. D., (2006). Protein bonding on biodegradable poly(l-lactide-co-caprolactone) membrane for esophageal tissue engineering. *Biomaterials*. Vol. 27, No. 1, s. 68-78.

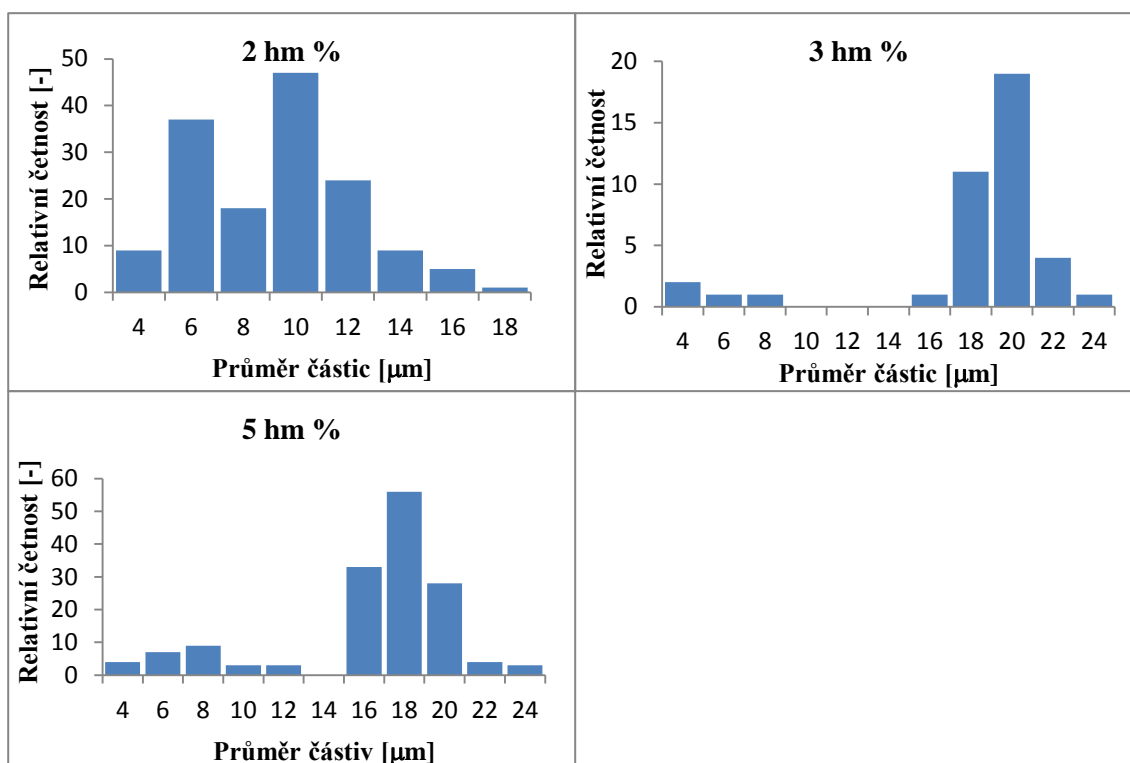
Příloha 1: Doplnění kapitoly 3.1.1.1





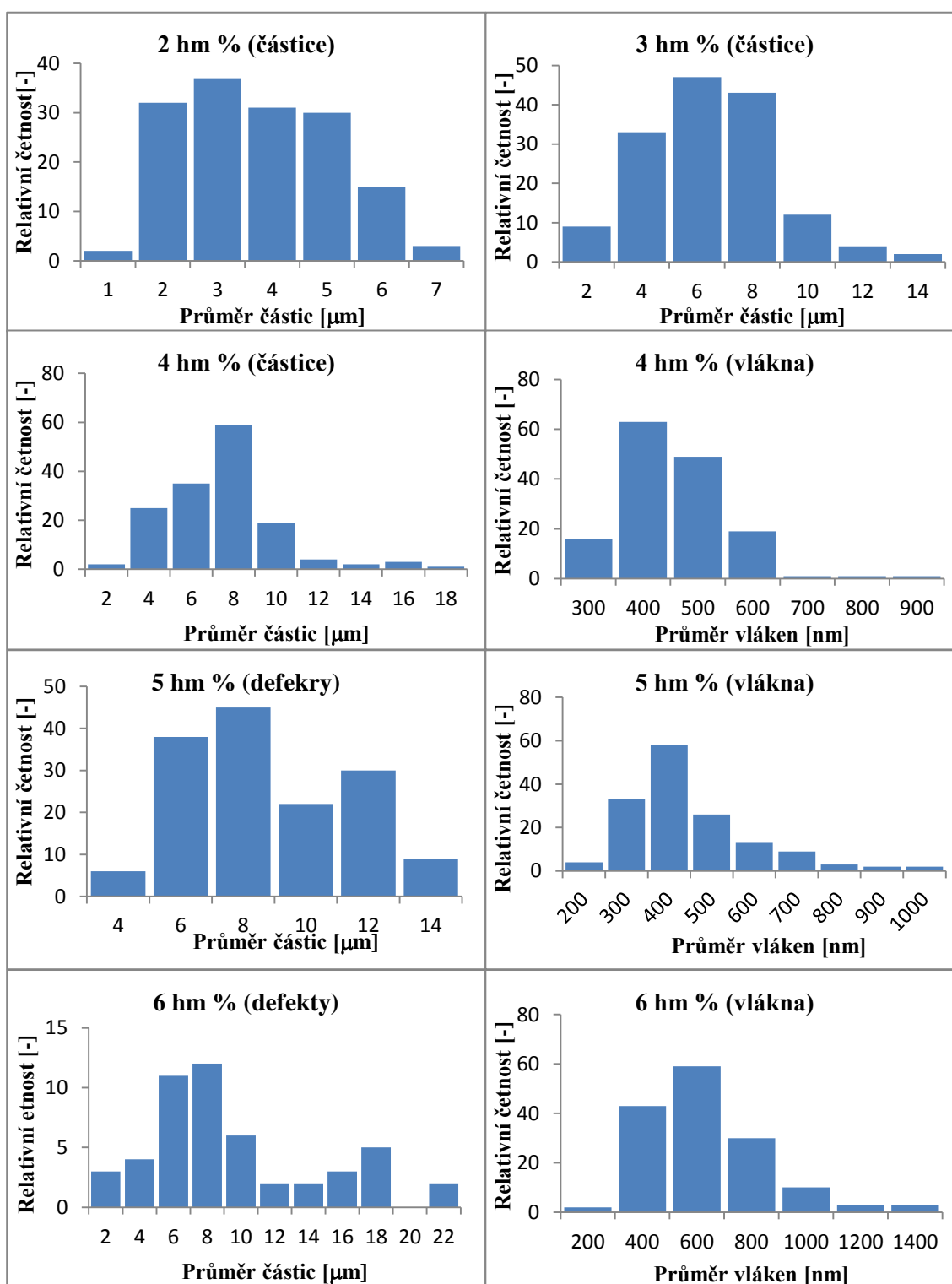
Obr.P1 Histogramy hustoty pravděpodobnosti pro průměry částic pro PLC v různých poměrech monomerů. (A),(B) PLC 70:30; (C), (D), (E) PLC 50:50; (F), (G), (H), (I) PLC 30:70.

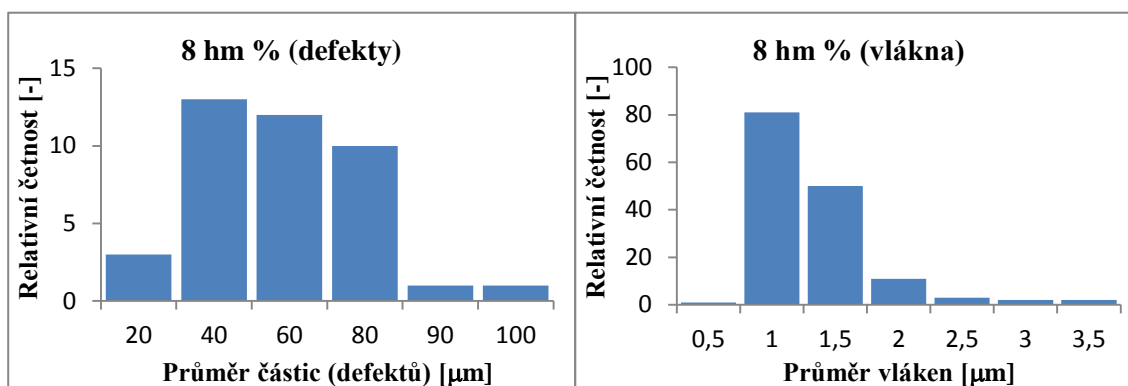
Příloha 2: Doplnění kapitoly 3.1.1.2



Obr. P2 Histogramy hustoty pravděpodobnosti pro průměry PLC 70:30 částic. 2 hm %, 3hm %, 5 hm%. (Rozpouštědlo chloroform).

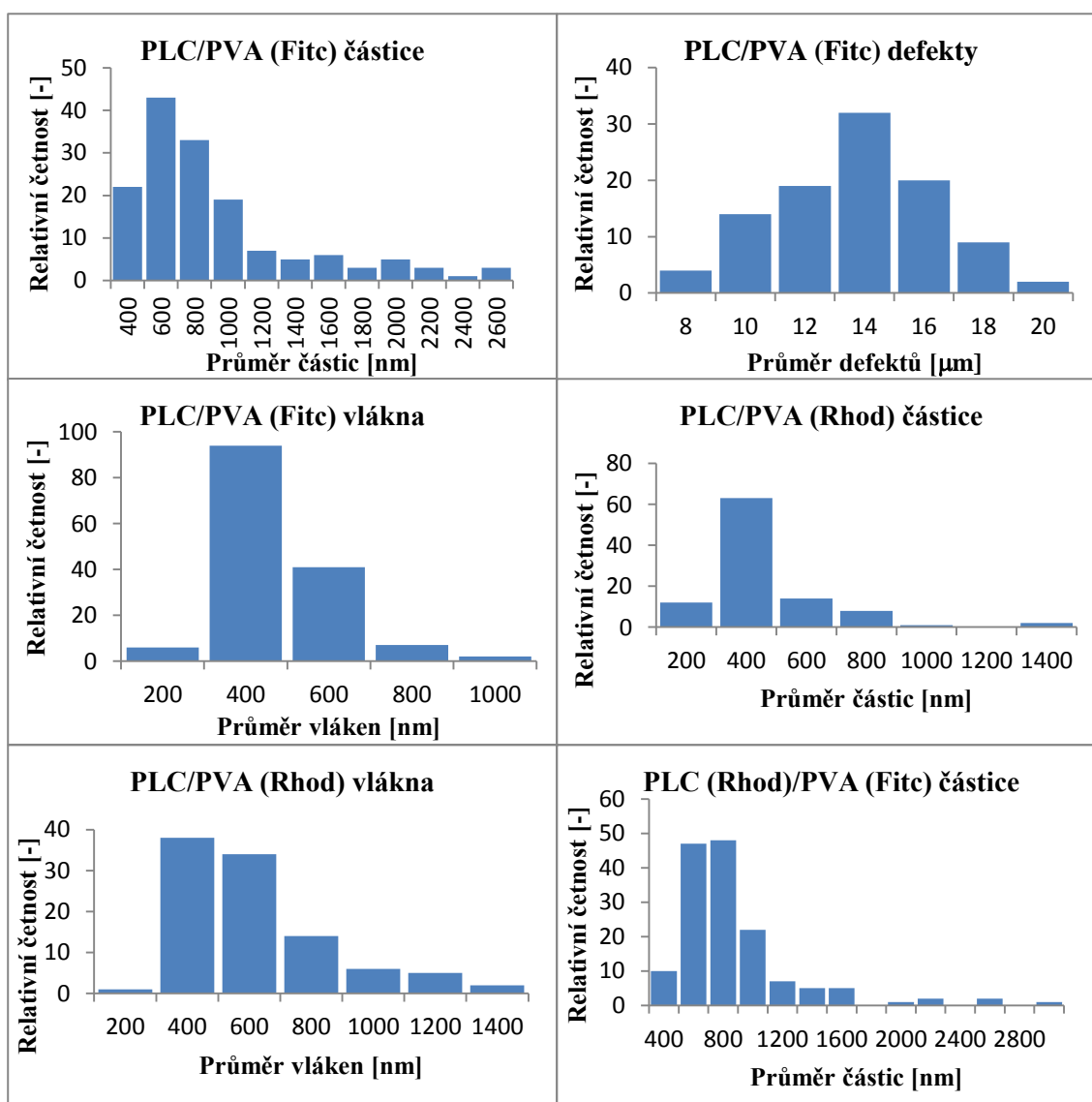
Příloha 3: Doplnění kapitoly 3.1.1.3

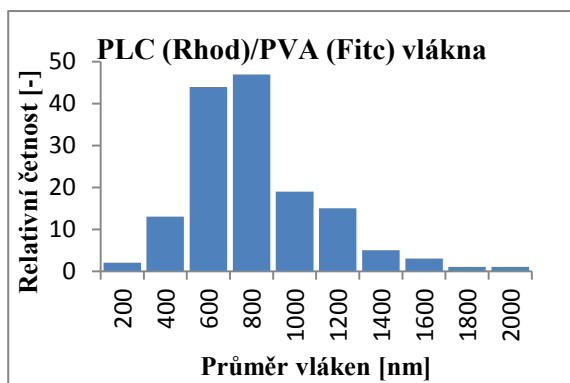




Obr. P3 Histogramy hustoty pravděpodobnosti pro průměry PLC 70:30 částic (defektů) a vláken. Částice 2hm%, 3 hm %, 4 hm%, 5 hm%, 6 hm %, 8 hm %; vlákna 4 hm %, 5 hm %, 6 hm % a 8 hm %.

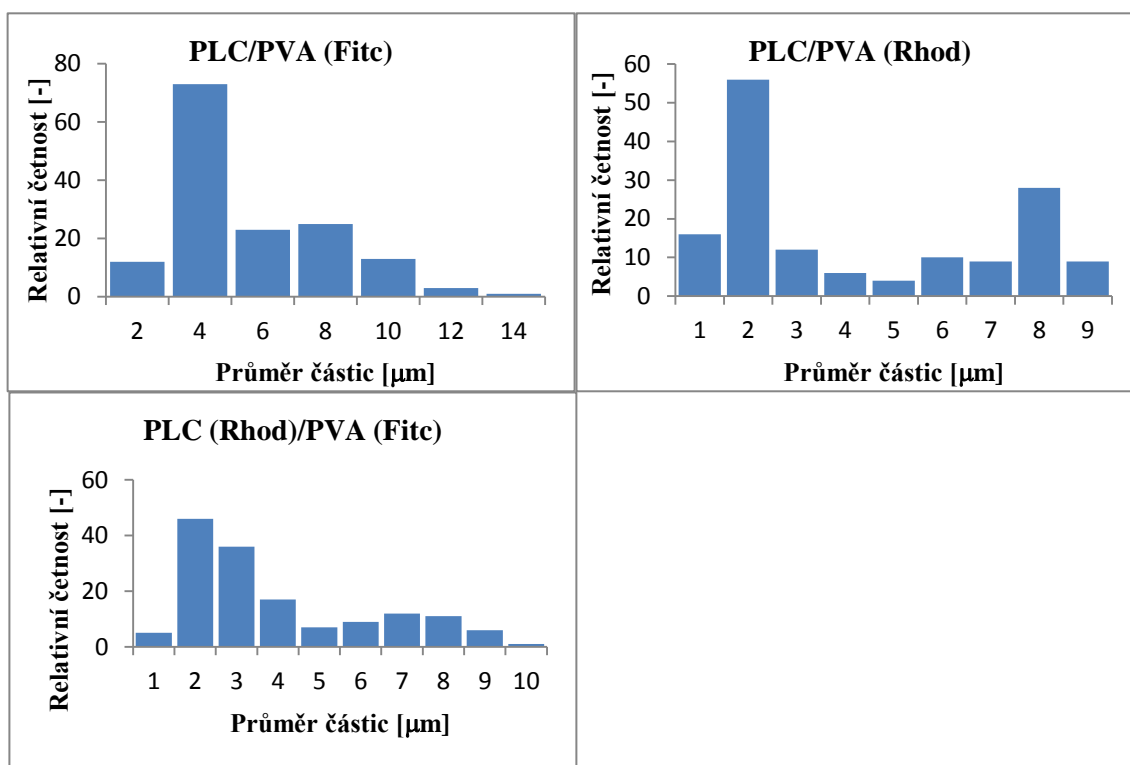
Příloha 4: Doplnění kapitoly 3.2.1.1





Obr. P4 Histogramy hustoty pravděpodobnosti pro průměry PLC vláken (defektů) a PVA částic.
(Různé modifikace obarvení polymerů).

Příloha 5: Doplnění kapitoly 3.2.1.2



Obr. P5 (B) Histogramy hustoty pravděpodobnosti pro průměry částic PLC/PVA (2 hm%, rozpouštědlo chloroform)

Příloha 6: Doplnění kapitoly 3.3*Tab. P6 Předpis pro přípravu zásobního roztoku pufru Tris (pH 8).*

Chemikálie		Množství	Koncentrace
Voda	H ₂ O	800 ml	-
Tris	(HOCH ₂) ₃ CNH ₂	12,14 g	0,1 M
Azid sodný	Na ₃ N	0,2 g	-
Kyselina chlorovodíková	HCl	několik kapek	99,99 %

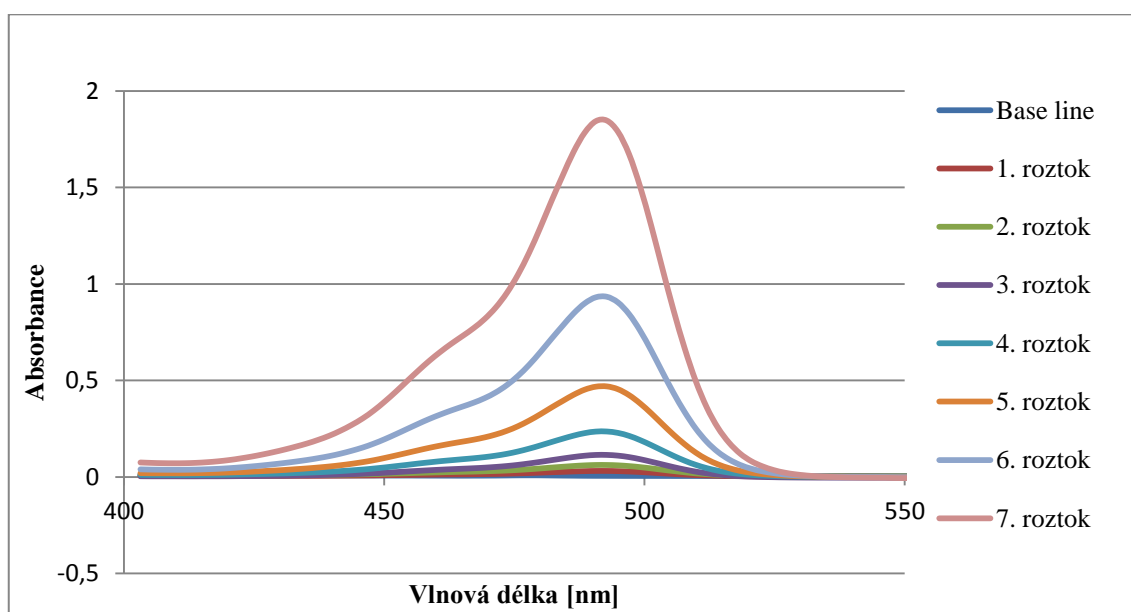
V 800 ml destilované vody se rozmíchalo 12,14 g Trisu a 0,2 g azidu sodného, následně bylo pomocí kyseliny chlorovodíkové upraveno pH na hodnotu 8 (přidávala se po kapkách, dokud se pH neustálilo. Tento roztok byl poté doplněn opět destilovanou vodou do 1 litru.

Příloha 7: Doplnění kapitoly 3.3.3*Tab. P7 (A) Maximální naměřené hodnoty absorbance pro příslušné koncentrace roztoků Trisu s FITCEM.*

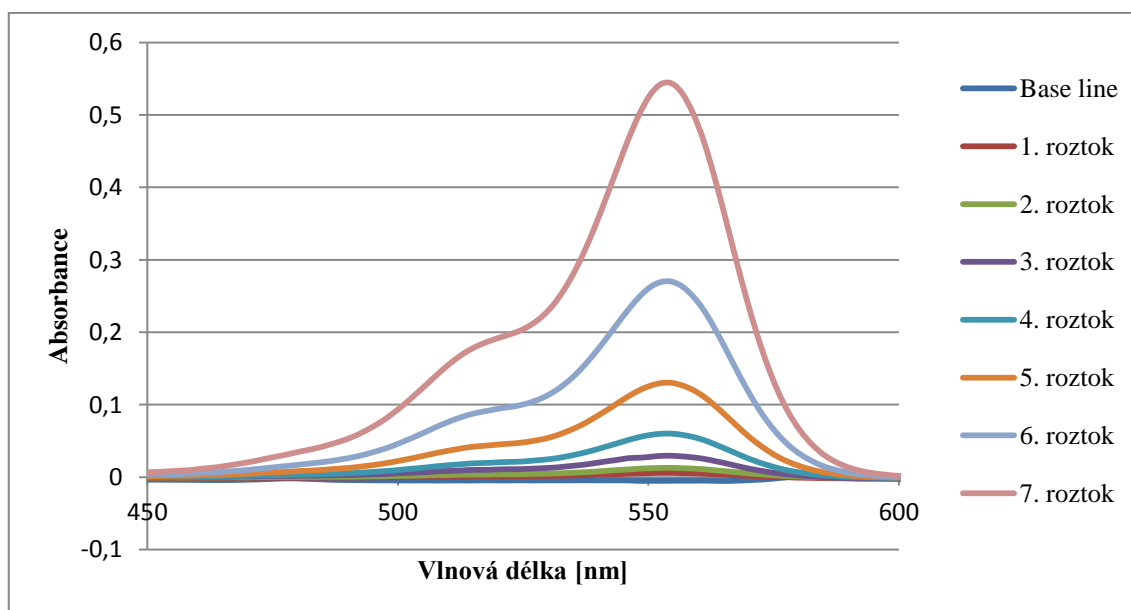
Roztok	1. roztok	2. roztok	3. roztok	4. roztok	5. roztok	6. roztok	7. roztok
Koncentrace	1,56E-06	3,13E-06	6,25E-06	1,25E-05	2,50E-05	5,00E-05	1,00E-04
Max. absorbance	0,031468	0,062304	0,114439	0,235747	0,469421	0,933536	1,846185

Tab. P7 (B) Maximální naměřené hodnoty absorbance pro příslušné koncentrace roztoků Trisu s Rhodaminem B.

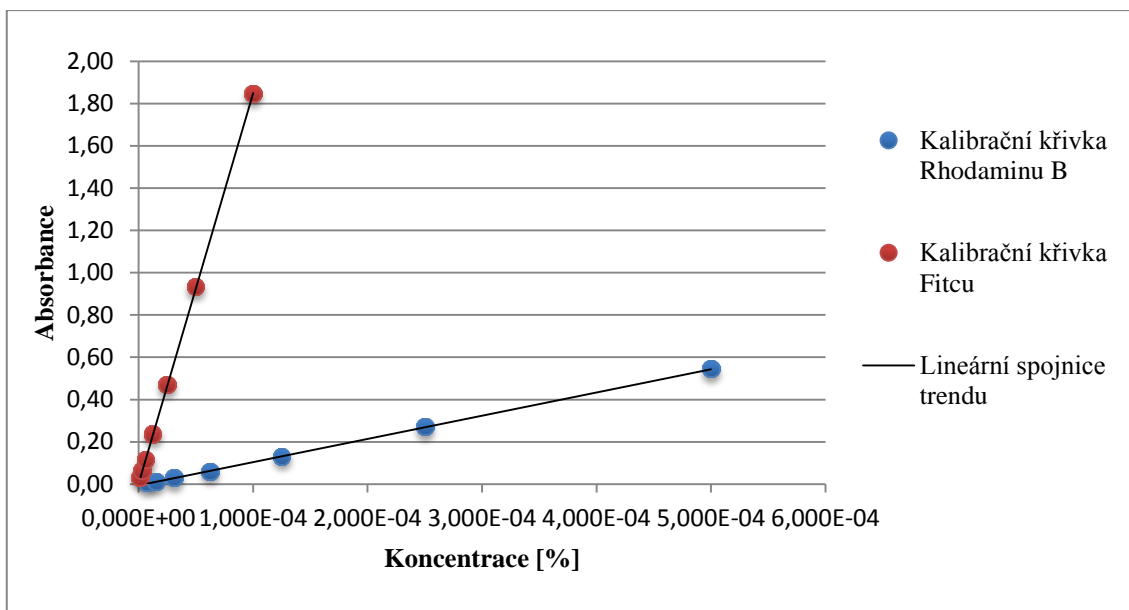
Roztok	1. roztok	2. roztok	3. roztok	4. roztok	5. roztok	6. roztok	7. roztok
Koncentrace	7,813E-06	1,563E-05	3,125E-05	6,250E-05	1,250E-04	2,500E-04	5,000E-04
Max absorbance	0,005875	0,012824	0,029464	0,060034	0,130133	0,269855	0,543343



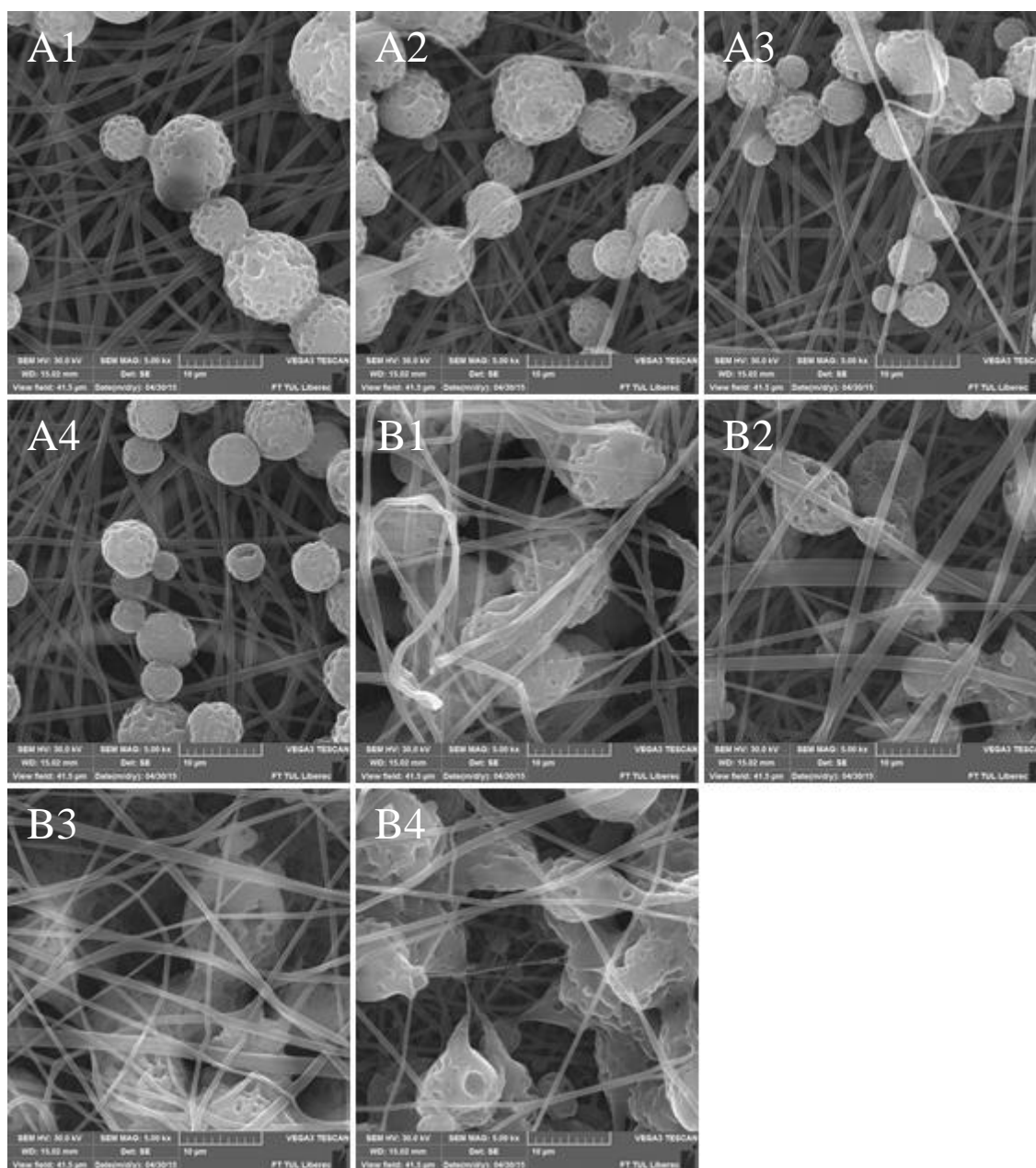
Obr. P7 (C) Graf závislosti absorbance na koncentraci kalibračních roztoků obarvených FITCEM v intervalu vlnové délky 400 – 550 nm.



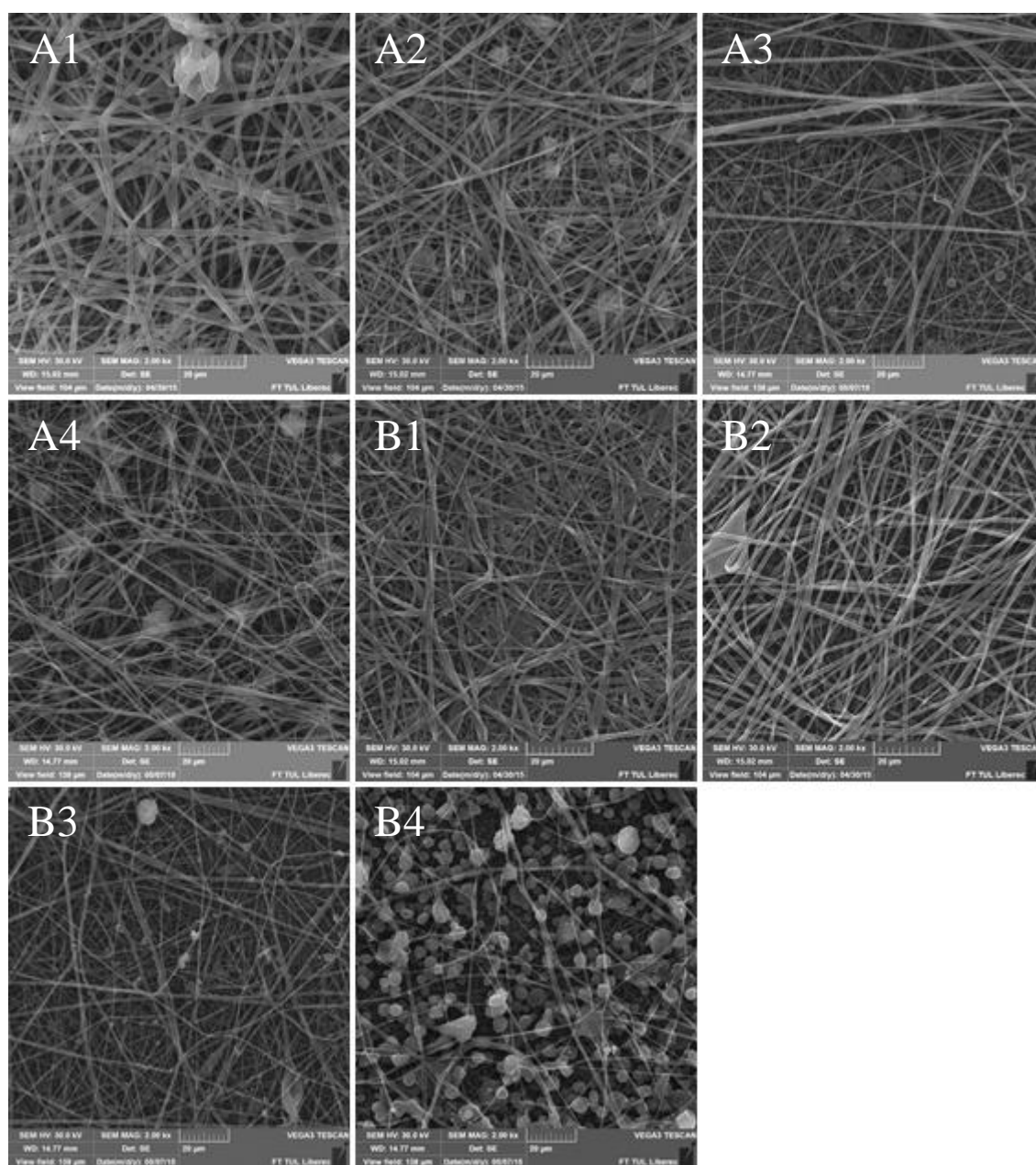
Obr. P7 (D) Graf závislosti absorbance na koncentraci kalibračních roztoků obarvených Rhodaminem B v intervalu vlnové délky 450 – 600 nm.



Obr. P7 (E) Graf znázorňující kalibrační křivku pro roztok Trisu s FITCEM a Trisu s Rhodaminem.

Příloha 8: Doplnění kapitoly 3.3.3.1

Obr. P8 Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu. (A) PVB + PLC/PVA (FITC), (B) PVB + PLC (Rhodamin B)/PVA (FITC): (1) Po jedné hodině, (2) Po dvou hodinách, (3) Po třech hodinách, (4) Negativní kontrola. Zvětšení (5000x)

Příloha 9: Doplnění kapitoly 3.3.3.2

Obr. P9 Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu. (A) PVB + PLC/PVA (FITC), (B) PVB + PLC (Rhodamin B)/PVA (FITC): (1) Po prvním dni, (2) Po druhém dni, (3) Po třech dnech, (4) Negativní kontrola. Zvětšení (2000x)